



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Cynthia GIRARDI**

**le** mardi 30 juin 2015

**Titre :**

Recherche d'accepteurs de Michael à visées antiparasitaires à partir d'une  
Asteraceae : *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED SDM : Chimie, Biologie, Santé - CO 042

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement (PHARMA-DEV)

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Professeur Nicolas FABRE

Docteur Valérie JULLIAN

**Jury :**

M. Michael BALTAS, Directeur de Recherche CNRS

Président

M. Louis MAES, Professeur à l'Université d'Anvers

Rapporteur

M. Alexios-Leandros SKALTSOUNIS, Professeur à l'Université d'Athènes

Rapporteur

M. Pierre DUEZ, Professeur à l'Université de Mons

Examineur

Mme Joëlle QUETIN-LECLERCQ, Professeur à l'Université Catholique de Louvain

Examineur

M. Vincent ROUMY, Maître de Conférences à l'Université de Lille 2

Examineur

M. Nicolas FABRE, Professeur à l'Université de Toulouse 3, Paul Sabatier

Directeur de Thèse

Mme Valérie JULLIAN, Chargée de Recherche IRD

Co-directrice de Thèse



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

**Présentée et soutenue par :**

**Cynthia GIRARDI**

le mardi 30 juin 2015

**TITRE :**

**Recherche d'accepteurs de Michael à visées antiparasitaires à partir d'une Asteraceae :  
*Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist**

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED SDM : Chimie, Biologie, Santé – CO 042

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement (PHARMA-DEV)

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Professeur Nicolas FABRE

Docteur Valérie JULLIAN

**Jury :**

M. M. BALTAS	Directeur de Recherche CNRS	Président
M. L. MAES	Professeur à l'Université d'Anvers	Rapporteur
M. A-L. SKALTSOUNIS	Professeur à l'Université d'Athènes	Rapporteur
M. P. DUEZ	Professeur à l'Université de Mons	Examineur
Mme J. QUETIN-LECLERCQ	Professeur à l'Université Catholique de Louvain	Examineur
M. V. ROUMY	Maître de Conférences à l'Université de Lille 2	Examineur
M. N. FABRE	Professeur à l'Université de Toulouse 3	Directeur de Thèse
Mme V. JULLIAN	Chargée de Recherche IRD	Co-Directrice de Thèse

Laboratoire de Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement (PHARMA-DEV), IRD  
UMR 152 Université de Toulouse 3, Paul Sabatier, Faculté de Pharmacie, 35 chemin des Maraîchers,  
31400 Toulouse





## REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser tout d'abord mes remerciements à M. le Docteur Michel Baltas, Directeur du laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (SPCMIB) et membre de l'équipe Produits Naturels et Analogues : Synthèse et Mécanismes (PNASM), de l'Université Paul Sabatier (UPS) de Toulouse (France), pour avoir accepté de présider le jury de soutenance de ma thèse.

Je suis très honorée de remercier M. le Professeur Louis Maes, Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Biomédicales et Vétérinaires d'Anvers (Belgique) et Directeur du groupe de recherche Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygiene (LMPH) de l'Université d'Anvers ainsi que M. le Professeur Alexios-Leandros Skaltsounis, Président de la Faculté de Pharmacie d'Athènes (Grèce), Directeur du Département de Pharmacognosie et Chimie des Produits Naturels de la Faculté de Pharmacie d'Athènes et membre du groupe de recherche Natural Product and Medicinal Chemistry de l'Université d'Athènes pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Mes remerciements vont également à M. le Professeur Pierre Duez, Chef du Service de Chimie Thérapeutique et Pharmacognosie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Mons (Belgique) et Directeur du Département de Pharmacognosie, Bromatologie et Nutrition humaine (Plant Nut), de l'Université Libre de Bruxelles (ULB) pour sa présence au sein de mon jury.

Je remercie sincèrement Mme le Professeur Joëlle Quetin-Leclercq, Doyen de la Faculté de Pharmacie et des Sciences Biomédicale (FASB) de l'Université Catholique de Louvain (UCL) de Bruxelles (Belgique) et Directrice du groupe de recherche Pharmacognosy Research Group (GNOS), au sein du laboratoire Louvain Drug Research Institut (LDRI), pour sa présence au sein de mon jury.

Enfin, je tiens à remercier Monsieur le Docteur Vincent Roumy, Maître de Conférences en Pharmacognosie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Lille 2 (France) et membre du Groupe de Recherche Interdisciplinaire et Optimisation Thérapeutique (GRIIOT), équipe Substances d'Origine Naturelle, pour avoir accepté de participer à mon jury.

*Ce travail a été effectué en majeure partie au sein du laboratoire de Pharmacologie et Pharmacochimie pour le développement, PHARMA-DEV, unité mixte de recherche entre l'Université Paul Sabatier III (UPS) et l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD), sous la direction de M. le Professeur Nicolas Fabre et la co-direction de Mme le Docteur Valérie Jullian, chargée de recherche à l'IRD.*

*Le travail analytique réalisé en LC-MS a été effectué lors d'un stage de 3 mois au sein du laboratoire Pharmacognosy Research Group (GNOS) du Louvain Drug Research Institut (LDRI), à Bruxelles, sous la direction de Mme le Professeur Joëlle Quetin-Leclercq.*

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, Nicolas Fabre, qui m'a encadrée pendant toute la durée de ce doctorat. Je le remercie tout d'abord en qualité de directeur de thèse pour ses encouragements, pour l'ensemble des conseils scientifiques prodigués et la disponibilité dont il fait preuve systématiquement, malgré ses responsabilités croissantes. Je tiens ensuite à lui faire part de ma reconnaissance pour ses qualités humaines, son intégrité, son accessibilité, pour savoir se montrer chaleureux et même drôle, parfois ! Toutes ces qualités ont rendu le travail sous sa direction agréable et très formateur.

Je remercie chaleureusement ma co-directrice de thèse, Valérie Jullian, pour son aide tout au long de ce parcours et cela même depuis l'autre bout du monde, ses conseils avisés et son optimisme permanent, si revigorant.

Je les remercie enfin tous deux sincèrement pour leur confiance, pour m'avoir permis d'être autonome et pour m'avoir donné de belles opportunités durant la réalisation de cette thèse. Vous m'avez permis d'enseigner en Pharmacognosie durant trois années et laissée prendre part intégrante aux choix pédagogiques. Vous avez réuni les fonds nécessaires pour me permettre d'assister à l'ICNPR en 2012, à New York, alors que je n'étais qu'une jeune doctorante en première année. Vous m'avez également donné l'opportunité de réaliser un stage formateur à l'étranger et tant d'autres choses, afin de construire ma carrière au mieux. Je vous suis reconnaissante pour tout cela et vous tiens tous les deux en très haute estime pour toutes vos qualités.

Je tiens également à adresser mes sincères remerciements au Professeur Joëlle Quetin-Leclercq pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pendant ces quelques mois de stage et avoir tout mis en œuvre pour me permettre de réaliser mes recherches dans les meilleures conditions matérielles et humaines. Cette expérience au sein du LDRI fut très enrichissante, tant du point de vue scientifique que personnel.

*Je tiens ensuite à remercier toutes les personnes qui ont participé directement à ce travail de recherche.*

Tout d'abord, au sein du laboratoire PHARMA-DEV, tous mes remerciements vont à Lucie Paloque, pour l'évaluation des activités biologiques de mes composés sur Leishmanies, ainsi que German Gonzalez Aspajo et Yenny Lozano Jimenez. Je vous suis vraiment très reconnaissante à tous les trois d'avoir pris sur votre temps de recherche pour la réalisation de ces tests. Je remercie bien sûr Agnès Aubouy, Clarisse Majorel et Saliha Mimar pour la réalisation des tests d'activité sur macrophages. Je remercie également Mme Isabelle Fourasté, non seulement pour m'avoir permis de réaliser l'étude microscopique de *P. spiralis*, mais aussi et surtout pour tous ses enseignements, ses anecdotes, sa joie de vivre et de transmettre aux autres.

Merci à Mme le Docteur Françoise Benoit-Vical (DR Inserm) et Arba Pramundita Ramadani, doctorante, pour la réalisation des tests sur *Plasmodium*.

Au sein du laboratoire LDRI, je remercie sincèrement Marie-France Herent qui m'a grandement aidée dans la réalisation des analyses LC-MS. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance au Professeur Jacques Poupaert et au Docteur Coco Kapanda Nankwa pour leur expertise scientifique, le temps et l'aide consacrés à mes côtés à la compréhension des spectres RMN et du comportement de mes composés. Coco, je te remercie également pour ton amitié et me souviens avec nostalgie de nos conversations philosophiques, entre deux molécules.

*Plus généralement, je souhaite remercier ici toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.*

Merci aux membres du personnel du LDRI et plus particulièrement à l'équipe GNOS. Merci à vous tous pour votre accueil chaleureux et les bons moments partagés au cours de mon stage à Bruxelles dont je garderai toujours un excellent souvenir.

Mes remerciements s'adressent ensuite à mes collègues du service de Chimie Thérapeutique aux côtés desquels j'ai eu le plaisir d'enseigner durant mon année d'ATER : Mme le Professeur Vania Bernardes Genisson, Céline Dereave, Pierre Verhaeghe, Cécile Arellano, Hélène Ternet Fontebasso et Claire Giamarchi-Medale. Merci à vous pour votre bienveillance durant cette année chargée.

Je souhaite aussi mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein du laboratoire PHARMA-DEV.

Je remercie tout d'abord mes plus proches collègues, Mohamed Haddad, Anne-Cécile Le Lamer, ainsi que Guillaume Marti et Marieke Vansteelandt nouvellement recrutés, qui forment une équipe dynamique et enthousiaste. Merci pour les bons moments passés ensemble, que ce soit au labo, en enseignement, ou autour d'un petit verre. Merci pour votre aide, vos conseils et votre soutien. Anne-Cécile, Marieke, je n'ai jamais autant apprécié la mycologie qu'à vos côtés !

Merci également à M. Claude Moulis, maintenant Professeur Emérite et Mme Thi Hadang, récemment retraitée, pour m'avoir si bien accueillie dans leur équipe pédagogique.

J'adresse ici mes sincères remerciements et mon témoignage d'affection à Luyen, ma co-doctorante et surtout mon amie. Lulu, nous avons commencé cette aventure ensemble, avons « grandi » et nous sommes enrichies aux côtés l'une de l'autre durant tout ce temps. Je profite de cet espace pour te dire à quel point je te trouve courageuse, persévérante et te souhaiter beaucoup de réussite et de bonheur dans ta nouvelle vie. Merci aussi de m'avoir initiée à la cuisine vietnamienne et aux rudiments du Da Cáu pendant nos pauses détentes!

Je remercie tout spécialement les stagiaires de notre équipe pour leur aide, leur patience et pour le café ! Merci à vous tous, Antoine (Bras cassé) qui a essuyé les plâtres (c'est le cas de le dire), Alix (Fralix  $\alpha$ ) et François (Fralix  $\beta$ ), Mélanie, Chloé et Laura, Sarah, Eliza, Emilie, Doris, Julia, Marion et Laura. Bonne chance à tous pour la suite, dans vos carrières et vos vies.

Je passe ensuite une dédicace spéciale à tous les « d’jeun’s » du laboratoire avec qui nous avons passé de si bons moments, notamment à la pause déjeuner : Armelle (Armellounette), Pierre, Béa, Thu (VTT), Yen, Laure-Estelle (LEC), Lucie (Lyco), Clémence (Chlorestence), Rachid, Lina, Rémi, Arba, Sokhna, Stéphanie, Nambi, Ennaji, Solomia, Mireia, Vincent (Gandalf), Filip (Fifi), Fanny et Hary. Rien ne vaut les conseils avisés d’un bon horoscope et le sentiment de la tâche accomplie après une grille de mots croisés pour remonter le moral d’un thésard !

Je souhaite également remercier tout particulièrement Marie-Agnès Bellières, Franck Marie-Sainte et Eliane Péliou pour leur travail remarquable et leur aide au sein des méandres administratifs et des commandes. Mais merci surtout pour votre gentillesse, même dans les moments de rush ! Merci à Valérie Cristofoli pour son incroyable bonté et son professionnalisme. Merci pour toutes les conversations que nous avons partagées. Merci à Eric Deharo pour sa bonne humeur et son souci constant de l’autre. Merci à Stéphane Bertani pour son amitié et ses conseils. Merci à Geneviève Bourdy pour tous ses bons petits plats, sa gentillesse et son humour piquant ! Merci à Françoise Nepveu pour ses « rondes nocturnes » afin de s’assurer que nous allons bien. Enfin merci à Fabrice Colin, Paul-Louis Fabre, Jan Sudor, Karine Reybier, Alexis Valentin et tous les membres du personnel du laboratoire PHARMA-DEV pour les pauses café et tous les bons moments passés ensemble.

J’adresse également tous mes remerciements à Claire Racaud Sultan, chargée de recherche au Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan (CPTP) et Imen Nasri, doctorante, pour leur aide.

Je tiens à remercier l’Institut de Chimie de Toulouse (ICT) qui nous permet d’avoir accès à du matériel de pointe sur le campus. Mes remerciements vont tout particulièrement à Pierre Lavedan, Caroline Toppan et Marc Vedrenne du service commun de RMN pour leur patience dans la réalisation des analyses de RMN.

Je remercie le Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche pour le financement de ma bourse de thèse.

J’ai eu la chance durant ma thèse de rencontrer des personnes merveilleuses qui m’ont aidée, épaulée ou bien ont tout simplement fait un bout de chemin à mes côtés. Ces personnes sont si nombreuses que je ne pourrais toutes les nommer ici. Je souhaite tout de même saluer mes amis de parcours toulousain qui n’ont pas déjà été cités plus haut : Dr. Remy le Marseillais, Dr. Jérémy « l’extraction c’est facile », Dr. Stéphanie des Sciences Molles, Elodie d’Albi ; les amis de l’autre bout du monde German, Mauricio et Alvaro. Je salue mes amis de parcours bruxellois : Claire, Emilie et Simon. Merci pour nos super soirées, tous ces bons barbecues, les week-ends en vadrouille, et tous les moments anodins où vous étiez tout simplement là.

Et puis il y a ceux qui sont à mes côtés depuis presque toujours. Thaï, je te remercie vraiment pour ton amitié, ton soutien et tes allers-retours à Toulouse. Merci à Easyjet de ne pas m’avoir privée de tous ces mets vietnamiens cachés dans ton bagage à main ! Frederick, je n’ai pas de mots assez forts pour te remercier pour tout le soutien que tu m’apportes

constamment et cela depuis le début. Merci pour tes encouragements, ta confiance, l'intérêt que tu portes à mon travail et toutes tes attentions pour me rendre la vie plus facile et plus belle.

Finalement, je remercie ma famille, mes parents, mes grands-parents, mon frère et mon cousin pour leur soutien. A cette question tabou que vous ne pouviez vous empêcher de me poser « alors ta thèse, c'est pour quand ?? », et bien je vous réponds « je crois que ça y est ! »



## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>3</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>9</b>
<b>ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>14</b>
<b>TABLES DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>23</b>
<b>PARTIE A. TRAVAUX ANTÉRIEURS .....</b>	<b>27</b>
<b>I. Molécules électrophiles de type « Accepteurs de Michael ».....</b>	<b>29</b>
I. 1. « Accepteur de Michael » : définition.....	29
I. 2. Réactivité chimique .....	31
I. 3. Réactivité biologique .....	33
I. 4. Cibles biologiques des Accepteurs de Michael .....	35
I. 4.1. Protéases à cystéine.....	35
I. 4.2. Protéines kinases.....	37
I. 4.3. Autres cibles enzymatiques.....	39
I. 4.4. Systèmes REDOX.....	40
I. 4.5. Voies de signalisation .....	41
I. 5. Potentiel thérapeutique des accepteurs de Michael dans les infections parasitaires	45
I. 5.1. Inhibition des systèmes enzymatiques et REDOX des parasites .....	45
I. 5.2. Modulation de l'immunité de l'hôte .....	46
I. 5.2.1 Induction du récepteur scavenger CD36.....	46
I. 5.2.2 Induction de l'hème hoxygénase HO-1 .....	47
I. 6. Conclusion partielle .....	48
<b>II. Données botaniques de la plante étudiée .....</b>	<b>50</b>
II. 1. Les Asteraceae .....	50
II. 1.1. Position systématique.....	50
II. 1.2. Caractères généraux morphologiques des Asteraceae .....	52
II. 1.3. Intérêt des Asteraceae .....	53
II. 1.3.1 Intérêt économique des Asteraceae.....	53
II. 1.3.2 Intérêt thérapeutique des Asteraceae .....	54
II. 2. Le genre <i>Pseudelephantopus</i> J.B. Rohr .....	55
II. 2.1. Position systématique.....	55

II. 2.2. Caractères généraux morphologiques du genre <i>Pseudelephantopus</i> J.B. Rohr	56
II. 2.3. Distribution géographique du genre.....	57
II. 3. <i>Pseudelephantopus spiralis</i> (Less.) Cronquist.....	58
II. 3.1. Nomenclature et statut de l'espèce .....	58
II. 3.2. Description botanique .....	59
II. 3.3. Distribution géographique de l'espèce.....	61
II. 3.4. Données ethnopharmacologiques et phytochimiques de <i>Pseudelephantopus spiralis</i>	61
II. 3.4.1 Usages traditionnels de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> .....	61
II. 3.4.2 Propriétés biologiques de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> .....	62
II. 4. Données phytochimiques .....	63
II. 4.1. Concernant les Asteraceae .....	63
II. 4.2. Concernant la tribu des Vernonieae .....	63
II. 4.3. Concernant le genre <i>Pseudelephantopus</i> J.B. Rohr .....	64
<b>III. Les lactones sesquiterpéniques .....</b>	<b>70</b>
III. 1. Généralités .....	70
III. 2. Structures .....	70
III. 3. Biogénèse.....	72
III. 4. Modifications structurales des STLs.....	75
III. 5. Esters de piptocarphol/piptocarphines ou hirsutinolides .....	75
III. 5.1. Généralités .....	75
III. 5.2. Biosynthèse et mécanisme de formation.....	76
III. 6. Propriétés biologiques des STLs.....	79
III. 6.1. Propriétés des STLs au sein de la plante.....	79
III. 6.2. Propriétés biologiques et thérapeutiques des STLs .....	80
III. 7. Conclusion partielle .....	83
<b>PARTIE B. TRAVAUX PERSONNELS.....</b>	<b>85</b>
<b>I. Étude morphologique de <i>P. spiralis</i> .....</b>	<b>88</b>
I. 1. Morphologie du fruit.....	88
I. 2. Section transversale de la feuille.....	89
I. 3. Analyse microscopique de la plante pulvérisée .....	91
<b>II. Extractions, fractionnements et purification des composés .....</b>	<b>94</b>
II. 1. Travaux préliminaires : criblage de l'activité biologique .....	94
II. 1.1. Tests biologiques sur les extraits éthanoliques des lots A et B.....	94
II. 1.2. Tests biologiques sur les extraits aqueux et éthanolique du lot E.....	94
II. 1.3. Extraction des lots A et B .....	95
II. 1.4. Fractionnement bioguidé de l'extrait A1 .....	97
II. 2. Optimisation de l'extraction .....	101
II. 2.1. Extraction du lot C .....	101



II. 2.2. Extraction du lot D.....	101
II. 2.3. Extraction du lot E.....	102
II. 3. Purification des composés.....	103
II. 3.1. Purification du composé PS1 à partir de A1.....	103
II. 3.2. Purification des composés PS9 et PS11 à partir de A2.....	104
II. 3.3. Purification des composés PS11 et PS13 à partir de la réunion de A1 et B1	106
II. 3.4. Purification des composés PS9, PS13, PS14, PS15, PS16 et PS17 à partir de CA	108
II. 3.5. Purification des composés PS11 et PS13 à partir du lot E.....	111
II. 4. Bilan de fractionnement et molécules isolées.....	112
<b>III. Identification des hirsutinolides isolés .....</b>	<b>115</b>
III. 1. Détermination structurale de PS9 .....	115
III. 1.1. Spectroscopie de masse.....	115
III. 1.2. Spectroscopie RMN .....	116
III. 2. Détermination structurale de PS11 .....	124
III. 2.1. Spectroscopie de masse.....	124
III. 2.2. Spectrométrie de RMN .....	125
III. 3. Détermination structurale de PS13 .....	129
III. 3.1. Spectrométrie de masse.....	129
III. 3.2. Spectrométrie de RMN .....	130
III. 4. Détermination structurale de PS14 .....	134
III. 4.1. Spectrométrie de masse.....	134
III. 4.2. Spectrométrie de RMN .....	135
III. 5. Détermination structurale de PS15 .....	137
III. 5.1. Spectrométrie de masse.....	137
III. 5.2. Spectrométrie de RMN .....	138
III. 6. Détermination structurale de PS16 .....	142
III. 6.1. Spectroscopie de masse.....	142
III. 6.2. Spectroscopie RMN .....	143
III. 7. Détermination structurale de PS17 .....	146
III. 7.1. Spectroscopie de masse.....	146
III. 7.2. Spectrométrie de RMN .....	146
<b>IV. Discussion sur les données RMN des hirsutinolides .....</b>	<b>149</b>
IV. 1. Optimisation des conditions d'acquisition .....	149
IV. 1.1. Résolution et élargissement des signaux de RMN $^1\text{H}$ .....	149
IV. 1.2. Signaux de RMN $^{13}\text{C}$ en <i>J-modulé</i> et <i>zgpg30</i> .....	151
IV. 2. Détermination des configurations relatives des hirsutinolides .....	154
IV. 3. Détermination des conformations .....	158
IV. 4. Discussion.....	166
<b>V. Études de la fragmentation des hirsutinolides .....</b>	<b>168</b>
V. 1. Infusion directe .....	168

V. 1.1.	Analyses en Full-HRMS-ESI(+)	168
V. 1.2.	Analyses en HRMS-ESI(+)-MS <sup>n</sup>	169
V. 2.	Analyse par UHPLC-HRESI(+)-MS	175
V. 2.1.	Profils chromatographiques	175
V. 2.2.	Fragmentation	180
V. 3.	Application de la méthode UHPLC-DAD-ESI-MS <sup>n</sup> /MS à la déréplication d'un extrait de <i>P. spiralis</i>	186
V. 4.	Discussion	191
<b>VI.</b>	<b>Évaluation de l'activité biologique des composés</b>	<b>193</b>
VI. 1.	Évaluation de l'activité antipaludique	193
VI. 2.	Évaluation de l'activité leishmanicide	194
VI. 3.	Évaluation de l'activation des monocytes/macrophages humains	195
VI. 3.1.	Expression de gènes cibles, contrôlée par RT-qPCR	196
VI. 3.1.1	Expression des ARNm de gènes cibles par des monocytes humains non transformés	197
VI. 3.1.2	Expression des ARNm par les monocytes transformés en macrophages	198
VI. 3.2.	Expression de CD36 contrôlée par cytométrie de flux	199
VI. 4.	Discussion	202
<b>PARTIE C.</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>213</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>		<b>219</b>
<b>I.</b>	<b>Matériel végétal</b>	<b>221</b>
I. 1.	Collecte et identification du matériel végétal	221
I. 2.	Préparation des lots	221
I. 2.1.	Séchage	221
I. 2.2.	Conservation des lots	222
I. 3.	Extraction	222
I. 4.	Filtration sur charbon actif	222
<b>II.</b>	<b>Méthodes d'analyse micrographique d'une plante</b>	<b>223</b>
II. 1.	Montage des coupes	223
II. 1.1.	Préparation des coupes	223
II. 1.2.	Colorants et réactifs utilisés	223
II. 2.	Examen microscopique de la plante pulvérisée	223
<b>III.</b>	<b>Méthodes de chromatographie</b>	<b>224</b>
III. 1.	Chromatographie sur couche mince (CCM)	224
III. 1.1.	Phase stationnaire	224
III. 1.2.	Dépôts des échantillons sur CCM	224
III. 1.3.	Phases mobiles	224
III. 1.4.	Détection et révélateurs chimiques	225

III. 2. Chromatographies liquides Haute et Ultra Haute Performance.....	226
III. 2.1. HPLC-DAD .....	226
III. 2.2. UHPLC-DAD .....	226
III. 2.2.1Système UHPLC-DAD HITACHI (UMR 152, Toulouse).....	226
III. 2.2.2Système UHPLC-DAD ACCELA (LDRI, UCL, Bruxelles) .....	227
III. 3. Méthodes de chromatographies préparatives.....	227
III. 3.1. Chromatographie sur Colonnes ouvertes (CC) .....	227
III. 3.2. Chromatographie Liquide sous Moyenne Pression (MPLC).....	228
III. 3.3. Chromatographie sur silice greffée en C-18 .....	228
III. 3.4. Chromatographie d'exclusion stérique sur Sephadex LH-20 .....	228
III. 3.5. HPLC semi-préparative .....	229
<b>IV. Méthodes analytiques ou physico-chimiques .....</b>	<b>229</b>
IV. 1. Spectrométrie de masse.....	229
IV. 1.1. Spectrométrie de Masse Basse Résolution (MS) .....	229
IV. 1.2. Spectrométrie de Masse Haute Résolution (HRMS) .....	229
IV. 2. Couplage UHPLC-HRMS (ESI).....	230
IV. 3. Résonance Magnétique Nucléaire.....	231
<b>V. Tests biologiques .....</b>	<b>231</b>
V. 1. Tests biologiques de criblage.....	231
V. 2. Évaluation de l'activité leishmanicide .....	232
V. 2.1. Activité antileishmanienne sur promastigotes .....	232
V. 2.2. Activité antileishmanienne sur amastigotes axéniques.....	233
V. 2.3. Activité antileishmanienne sur amastigotes intracellulaires .....	233
V. 3. Évaluation de la cytotoxicité sur macrophages et cellules VERO.....	234
V. 4. Évaluation de l'activité antipaludique .....	234
V. 5. Evaluation de l'activation de monocytes/macrophages humains .....	235
V. 5.1. Isolement des monocytes humains, différenciation en macrophages et traitement .....	235
V. 5.1.1 Obtention des monocytes humains .....	235
V. 5.1.2 Différenciation en macrophages issus de monocytes humains.....	236
V. 5.2. Test des composés sur la stimulation des monocytes/macrophages.....	236
V. 5.2.1 Préparation des échantillons .....	236
V. 5.2.2 Préparation des plaques.....	236
V. 5.2.3 Extraction de l'ARN et transcription inverse.....	236
V. 5.2.4 PCR quantitative .....	237
V. 5.2.5 Cytométrie en flux .....	237
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>239</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>267</b>

## ABRÉVIATIONS

AANE :	Acides Aminés Non Essentiels
Acétyl-CoA :	Acétyl-Coenzyme A
AcOEt :	Acétate d'éthyle
AKT :	Protéine Kinase B
ANSM :	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
APCI :	Ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APG :	Groupe de phylogénie des angiospermes (Angiosperm Phylogeny Group)
ARE :	Elément de l'ADN de réponse aux antioxydants (Antioxidant Response Element)
ATP :	Adénosine triphosphate
ATU :	Autorisation Temporaire d'Utilisation
C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> :	Benzène deutéré
CC :	Chromatographie sur Colonne ouverte
CC <sub>50</sub> :	Concentration Cytotoxique 50 : concentration induisant la mort cellulaire de 50% des cellules
CCC :	Chromatographie à contre-courant
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
CCMHP :	Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance
CD36 :	Cluster of Differentiation 36
CD <sub>3</sub> OD :	Méthanol deutéré
CDCl <sub>3</sub> :	Chloroforme deutéré
CDXG :	Kinases possédant dans leur séquence d'acides aminés le motif Cys-Asp-Xaa-Gly
CI <sub>50</sub> :	Concentration Inhibitrice 50 : concentration inhibant 50% d'une activité biologique
CIN :	Code International de Nomenclature des algues, champignons et plantes
COSY :	Spectroscopie de corrélation <i>via</i> les couplages scalaires (Correlated Spectroscopy)
DAD :	Détecteur à barrettes de diodes (Diode Array Detector)
DCI :	Ionisation chimique directe (Direct Chemical Ionization)
DMAPP :	Diméthylallylpyrophosphate
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
EGFR :	Récepteur de facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor Receptor)
ESI :	Ionisation par électronébulisation (ElectroSpray Ionization)
FACS :	Triage cellulaire par cytométrie de flux (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
FAO :	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization)
FDA :	Food and Drug Administration
FSC :	Forward SCatter
GEA :	Groupelement électroattracteur
HEPES :	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HMBC :	Corrélation hétéronucléaire à travers plusieurs liaisons (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

HO-1 :	Hème-oxygénase 1
HOMO :	Orbitale moléculaire occupée la plus haute (Highest Occupied Molecular Orbital)
HPLC :	Chromatographie Liquide Haute Pression (High Pressure Liquid Chromatography)
HRMS :	Spectrométrie de masse haute résolution (High Resolution Mass Spectrometry)
HSAB :	Principe régissant les acides/bases mous et durs (Hard and Soft Acids and Bases)
HSQC :	Spectroscopie hétéronucléaire simple quantum (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
IAPP :	Institut de Recherche de l'Amazonie Péruvienne (Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana)
ICT :	Institut de Chimie de Toulouse
IKK $\beta$ :	Inhibiteur de la kinase $\kappa$ B (Inhibitor of $\kappa$ B Kinase)
IKT :	Inhibiteur des tyrosines kinases
IPP :	Isopenténylpyrophosphate
IRD :	Institut de Recherche pour le Développement
IS :	Indice de Sélectivité
Keap1 :	Protéine régulatrice (Kelch-like erythroid cell-derived protein with CNC homology [ECH]-associated protein)
LDRI :	Louvain Drug Research Institut (UCL, Bruxelles, Belgique)
LTQ :	Analyseur trappe d'ion quadripolaire linéaire (Linear Trapping Quadrupole)
LUMO :	Orbitale moléculaire vacante la plus basse (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
<i>m/z</i> :	Rapport masse/charge atomique
MAA/20 :	Milieu de croissance Axénique pour Amastigote ( <i>Leishmani</i> )
Maf	Famille de facteurs de transcription (Musculoaponeurotic Fibrosarcoma)
MAO-B :	Monoamineoxydase B
MAPs :	Protéines-kinases (Mitogen-Activated Protein)
MASSMET :	Plateforme d'analyse chimique par spectrométrie de masse de métabolites et de composés d'intérêts pharmaceutique et biologique
MC :	Milieu de culture
MD :	Milieu de différenciation
MFI :	Intensité moyenne de la fluorescence d'une sous-population cellulaire (Mean Fluorescence Intensity)
MGL :	Lipase des monoglycérides
MMR	Récepteur du mannose sur les macrophages (Macrophage Mannose Receptor)
MPLC :	Chromatographie sous Moyenne Pression (Medium pressure Liquid Chromatography)
MRPs :	Protéines associées à des phénomènes de résistances multiples aux anticancéreux (Multidrug Resistance associated Proteins)
MS :	Spectrométrie de Masse (Mass Spectrometry)
M-SFM :	Milieu de culture pour macrophages, sans sérum (Macrophage Serum Free Medium)
MTT :	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
Nfr2 :	Facteur de transcription nucléaire (Nuclear factor-erythroid 2-related factor-2)

NOESY :	Spectroscopie de corrélation par effet Overhauser nucléaire (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)
NP :	Neuropaludisme
PBS :	tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline )
PPAR $\gamma$ :	Récepteur nucléaire gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\gamma$ )
ppm :	Partie par million
rM-CSF :	Facteur de stimulation de colonies de macrophages (Recombinant Macrophage Colony-Stimulating Factor)
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
rpm :	Rotations par minute
RPMI :	Milieu de cultures cellulaires (Roswell Park Memorial Institute)
RT-PCR :	Amplification en chaîne par polymérase après transcription inverse (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
SBF :	Sérum Bovin Fœtal
SPE :	Extraction en phase solide (Solid Phase Extraction)
SSC :	Side SCatter
STATs :	Facteurs de transcription (Signal Transducers and Activators of Transcription)
STLs :	Lactones Sesquiterpéniques
SVF :	Sérum de veau fœtal
TIC :	Courant ionique total (Total Ion Current)
TMS :	Tétraméthylsilane
UCL :	Université Catholique de Louvain (Bruxelles, Belgique)
UHPLC :	Chromatographie Liquide Ultra Haute Pression (Ultra High Pressure Liquid Chromatography)
UHPLC/HRMS :	Chromatographie liquide Ultra Haute Pression couplée à la Spectrométrie de Masse Haute Résolution
uma :	Unité de masse atomique
UMR :	Unité Mixte de Recherche
UNMSM :	Muséum National de l'Université de San Marcos (Lima, Pérou)
UPCH :	Université Péruvienne Cayetano Heredia (Lima, Pérou)
UPS :	Université Paul Sabatier
UV :	Ultraviolet

L'ensemble des unités fondamentales et dérivées (litre, volume, mesures métriques) est exprimé en système international d'unités (SI).

# TABLES DES ILLUSTRATIONS

## ➤ FIGURES

<b>Figure 1</b> : Systèmes donneurs de Michael (Rabasso, 2006) .....	29
<b>Figure 2</b> : Systèmes accepteurs de Michael (Rabasso, 2006) .....	30
<b>Figure 3</b> : Principe de vinylogie appliqué à une cétone $\alpha,\beta$ -insaturée .....	30
<b>Figure 4</b> : Mécanismes d'additions nucléophiles sur un système conjugué .....	31
<b>Figure 5</b> : Charges et polarisation d'un système carbonyle $\alpha,\beta$ -insaturé. ....	32
<b>Figure 6</b> : Niveaux d'interactions orbitales entre espèces molles et dures, selon le principe HSAB (Scudder, 2013) .....	32
<b>Figure 7</b> : Structure de la cystéine. ....	34
<b>Figure 8</b> : Mécanisme d'addition entre accepteurs de Michael et macromolécules biologiques nucléophiles présentant un groupe thiol (Johansson, 2012) .....	34
<b>Figure 9</b> : Structure du <b>Rupintrivir</b> , agent antiviral inhibiteur de la protéase C3 .....	36
<b>Figure 10</b> : Structure de la molécule <b>K11777</b> ou <b>K777</b> , un inhibiteur sélectif de la cruzaine chez <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	36
<b>Figure 11</b> : Structure de la hypothémycine, inhibiteur de kinases de <i>Trypanosoma brucei</i> ...	37
<b>Figure 12</b> : Structure du composé <b>E6201</b> , inhibiteur compétitif du site de liaison à l'ATP des kinases MEK.....	38
<b>Figure 13</b> : Rôle cellulaire des tyrosines kinases dans la cancérogenèse.....	39
<b>Figure 14</b> : Le système redox trypanothione.....	41
<b>Figure 15</b> : Voie de signalisation Keap1-Nrf2-ARE.....	43
<b>Figure 16</b> : Structure du diméthyl fumarate, activateur de la voie Nrf2 .....	44
<b>Figure 17</b> : Structure du méthyl de Bardoxolone activateur de la voie Keap1/Nrf2 et inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B .....	45
<b>Figure 18</b> : Voies de régulation du récepteur scavenger CD36 dans le macrophage/monocyte. ....	47
<b>Figure 19</b> : Cibles biologiques potentielles des systèmes accepteurs de Michael pour la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques antiparasitaires.....	49
<b>Figure 20</b> : Carte de la distribution mondiale de <i>Pseudelephantopus Rohr</i> , établie par pays.....	58
<b>Figure 21</b> : Photos de l'espèce <i>Pseudelephantopus spiralis</i> (Less.) Cronquist. ....	60
<b>Figure 22</b> : <i>Pseudelephantopus spiralis</i> (Less.) Cronquist .....	60
<b>Figure 23</b> : Carte de la distribution mondiale de <i>P. spiralis</i> (Less.) Cronquist établie par pays. ....	61
<b>Figure 24</b> : Les deux grands types de germacranolides isolés de la tribu des Vernonieae : les hirsutinolides et les glaucolides. ....	64
<b>Figure 25</b> : Structures des composés isolés de <i>P. spicatus</i> d'après la littérature.....	68
<b>Figure 26</b> : Les sept groupes principaux de lactones sesquiterpéniques d'après Schmidt (2006) et leurs interrelations d'après Fischer <i>et al.</i> (1979).....	71
<b>Figure 27</b> : Les différents sous-groupes des germacranolides établis en fonction de la stéréochimie de leurs doubles liaisons.....	72
<b>Figure 28</b> : Schéma de biogénèse des sesquiterpènes lactones.....	74

<b>Figure 29</b> : Structure générale des hirsutinolides.....	76
<b>Figure 30</b> : Structure du glaucolide A.....	76
<b>Figure 31</b> : Schéma de biogénèse hypothétique des hirsutinolides .....	78
<b>Figure 32</b> : Structure de l'artémisinine .....	81
<b>Figure 33</b> : Structure du parthénolide .....	82
<b>Figure 34</b> : Formation d'un bi-adduit entre la cynaropicrine (CYN) trypanocide et la trypanothione sous sa forme réduite (TSH) <sub>2</sub> .....	82
<b>Figure 35</b> : Lieux de récolte de <i>P. spiralis</i> au Pérou.....	87
<b>Figure 36</b> : <i>Pseudelephantopus spiralis</i> (Less.) Cronquist, fruit .....	89
<b>Figure 37</b> : <i>Pseudelephantopus spiralis</i> (Less.) Cronquist, feuille en section transversale....	90
<b>Figure 38</b> : <i>Pseudelephantopus spiralis</i> (Less.) Cronquist, poudre de feuilles .....	91
<b>Figure 39</b> : <i>Pseudelephantopus spiralis</i> (Less.) Cronquist, poudre de feuilles.....	92
<b>Figure 40</b> : <i>Pseudelephantopus spiralis</i> (Less.) Cronquist, poil tecteur bisérié du fruit.....	93
<b>Figure 41</b> : <i>Pseudelephantopus spiralis</i> (Less.) Cronquist, grain de pollen .....	93
<b>Figure 42</b> : Schéma du protocole d'extraction appliqué séparément aux <b>lots A et B</b> de <i>P. spiralis</i> .....	96
<b>Figure 43</b> : CCM comparative des extraits éther de pétrole des <b>lots A et B (A1 et B1)</b> et des extraits éthanoliques <b>A2 et B2</b> . .....	97
<b>Figure 44</b> : Fractionnement et bilan massique de l'extrait éther de pétrole <b>A1</b> , réalisé sur 1 g d'extrait.....	98
<b>Figure 45</b> : CMM récapitulative des fractions issues de l'extrait éther de pétrole <b>A1</b> . .....	99
<b>Figure 46</b> : Protocole d'extraction du <b>lot C</b> .....	101
<b>Figure 47</b> : Protocole d'extraction du <b>lot D</b> .....	102
<b>Figure 48</b> : Protocole d'extraction du <b>lot E</b> .....	102
<b>Figure 49</b> : CCM de la phase CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> issue du partage liquide/liquide de l'extrait aqueux du <b>lot E</b> entre CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> et H <sub>2</sub> O. ....	103
<b>Figure 50</b> : Schéma de purification du composé <b>PS1</b> à partir de 1 g de l'extrait éther de pétrole A1 (2,76 g).....	104
<b>Figure 51</b> : Schéma de purification des composés <b>PS9 et PS11</b> , à partir de 5 g de l'extrait éthanolique A2 (17,73 g). ....	105
<b>Figure 52</b> : Schéma de purification des composés <b>PS11 et PS13</b> , à partir de la réunion de l'extrait éther de pétrole B1 (2,78 g) et des 0,76 g restants de l'extrait éther de pétrole A1. ....	107
<b>Figure 53</b> : CCM récapitulative des fractions CA-1 à CA-11 avant leur filtration sur charbon actif. ....	108
<b>Figure 54</b> : Schéma de purification des composés <b>PS9, PS13, PS14, PS15, PS16 et PS17</b> à partir de la phase éther de pétrole CA (4,52 g). ....	109
<b>Figure 55</b> : CCM récapitulative des fractions CA-58-1 à CA-58-11.....	110
<b>Figure 56</b> : Schéma de purification des composés <b>PS11 et PS13</b> , à partir de la phase chloroformique EA de l'extrait aqueux (620 mg) du lot E.....	111
<b>Figure 57</b> : Structures des composés isolés de <i>P. spiralis</i> .....	112
<b>Figure 58</b> : CCM récapitulative des hirsutinolides isolés. ....	113
<b>Figure 59</b> : Spectre de masse du composé <b>PS9</b> obtenu en mode ESI positif.....	116
<b>Figure 60</b> : Spectre de RMN du <sup>13</sup> C en <i>J-modulé</i> du composé <b>PS9</b> (298 K, 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	117



<b>Figure 61</b> : Spectre de RMN du $^1\text{H}$ du composé <b>PS9</b> (298 K, 500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	119
<b>Figure 62</b> : Schéma des corrélations HMBC observées pour les hirsutinolides isolés .....	121
<b>Figure 63</b> : Corrélations HMBC observées pour la fonction $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ du composé <b>PS9</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 500 MHz) .....	121
<b>Figure 64</b> : Corrélations HMBC observées pour la fonction $-\text{COCH}_3$ du composé <b>PS9</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 500 MHz) .....	122
<b>Figure 65</b> : Structure du 8-acétyl-13-éthoxyptiocarphol, <b>PS9</b> (n° CAS 151593-37-2) .....	122
<b>Figure 66</b> : Comparaison des spectres de RMN $^1\text{H}$ obtenus pour le composé <b>PS9</b> , issu de deux fractionnements différents.....	123
<b>Figure 67</b> : Comparaison des intensités obtenues pour les signaux « parasites » présents sur le spectre proton du composé <b>PS9</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 300 MHz).....	124
<b>Figure 68</b> : Spectre de masse du composé <b>PS11</b> obtenu en mode ESI positif.....	125
<b>Figure 69</b> : Spectre de RMN du $^{13}\text{C}$ en <i>J-modulé</i> du composé <b>PS11</b> (298 K, 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	126
<b>Figure 70</b> : Spectre de RMN du $^1\text{H}$ du composé <b>PS11</b> (298 K, 300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	127
<b>Figure 71</b> : Corrélations HMBC observées pour les groupements acétyles du composé <b>PS11</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 300 MHz) .....	128
<b>Figure 72</b> : Structure du diacétylptiocarphol, <b>PS11</b> (n° CAS 101628-29-9) .....	128
<b>Figure 73</b> : Spectre de masse du composé <b>PS13</b> obtenu en mode ESI positif.....	130
<b>Figure 74</b> : Spectre de RMN du $^{13}\text{C}$ en <i>J-modulé</i> du composé <b>PS13</b> (298 K, 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	131
<b>Figure 75</b> : Spectre de RMN du $^1\text{H}$ du composé <b>PS13</b> (298 K, 300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	132
<b>Figure 76</b> : Corrélations HMBC observées pour les substituants du composé <b>PS13</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 300 MHz) .....	133
<b>Figure 77</b> : Structure de la ptiocarphine A, <b>PS13</b> (n° CAS 76248-63-0) .....	133
<b>Figure 78</b> : Spectre de masse du composé <b>PS14</b> obtenu en mode ESI positif.....	134
<b>Figure 79</b> : Spectre de RMN du $^1\text{H}$ du composé <b>PS14</b> (298 K, 300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	136
<b>Figure 80</b> : Structure de la ptiocarphine F, <b>PS14</b> .....	137
<b>Figure 81</b> : Spectre de masse du composé <b>PS15</b> obtenu en mode ESI positif.....	138
<b>Figure 82</b> : Spectre de RMN du $^{13}\text{C}$ en <i>J-modulé</i> du composé <b>PS15</b> (298 K, 125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	139
<b>Figure 83</b> : Spectre de RMN du $^1\text{H}$ du composé <b>PS15</b> (298 K, 500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	140
<b>Figure 84</b> : Corrélations HMBC observées pour les substituants du composé <b>PS15</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 300 MHz) .....	141
<b>Figure 85</b> : Structure de la ptiocarphine D, <b>PS15</b> (n° CAS 202524-98-9) .....	141
<b>Figure 86</b> : Spectre de masse du composé <b>PS16</b> obtenu en mode ESI positif.....	142
<b>Figure 87</b> : Spectre de RMN du $^{13}\text{C}$ en <i>J-modulé</i> du composé <b>PS16</b> (298 K, 125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	143
<b>Figure 88</b> : Spectre de RMN du $^1\text{H}$ du composé <b>PS16</b> (298 K, 500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	144
<b>Figure 89</b> : Corrélations HMBC observées pour le substituant du composé <b>PS16</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 500 MHz) .....	145
<b>Figure 90</b> : Structure du (1 <i>S</i> *,4 <i>R</i> *,8 <i>S</i> *,10 <i>R</i> *)-1,4-époxy-13-éthoxy-1,8,10-trihydroxygermacra-5 <i>E</i> ,7(11)-dièn-6, 12-olide, <b>PS16</b> (n° CAS 202522-40-5) .....	145

<b>Figure 91</b> : Spectre de masse haute résolution du composé <b>PS17</b> obtenu en mode ESI positif .....	146
<b>Figure 92</b> : Spectre de RMN du $^{13}\text{C}$ en <i>J-modulé</i> du composé <b>PS17</b> (298 K, 125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	147
<b>Figure 93</b> : Spectre de RMN du $^1\text{H}$ du composé <b>PS17</b> (298 K, 500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	148
<b>Figure 94</b> : Structure du piptocarphol, <b>PS17</b> .....	148
<b>Figure 95</b> : Spectre de RMN $^1\text{H}$ du composé <b>PS11</b> ( $\text{CDCl}_3$ ) obtenu à 298 K (300 MHz) ...	149
<b>Figure 96</b> : Spectres de RMN $^1\text{H}$ du composé <b>PS11</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz), obtenus à différentes température : 47°C (spectre <b>C</b> ), 25°C (spectre <b>B</b> ) et 1°C (spectre <b>A</b> ) .....	150
<b>Figure 97</b> : Spectre de RMN du $^{13}\text{C}$ en <i>J-modulé</i> du composé <b>PS11</b> (298 K, 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	152
<b>Figure 98</b> : Spectre de RMN du $^{13}\text{C}$ en <i>J-modulé</i> du composé <b>PS11</b> (320 K, 75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	153
<b>Figure 99</b> : Spectre de RMN du $^{13}\text{C}$ du composé <b>PS11</b> acquis avec l'expérience zgpg30 ...	154
<b>Figure 100</b> : Spectre de RMN 2D NOESY du composé <b>PS11</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 298 K, 125 MHz) et corrélations NOESY observées.....	156
<b>Figure 101</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>PS15</b> obtenu dans le $\text{CD}_3\text{OD}$ (304 K, 500 MHz) .....	159
<b>Figure 102</b> : Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>PS15</b> obtenu dans le $\text{CD}_3\text{OD}$ (304 K, 125 MHz).....	160
<b>Figure 103</b> : Variations moyennes des déplacements chimiques $\delta_{\text{C}}$ du noyau hirsutinolide, obtenues pour la forme B par rapport à la forme A. ....	163
<b>Figure 104</b> : Structures du composé <b>PS15</b> (en haut à gauche) et de l'hirsutinolide de structure proche isolé par Borkosky <i>et al.</i> (1997) (en haut à droite) et leurs représentations 3D respectives (en bas, à gauche et à droite) (Crédit image : ChemDraw®.).....	165
<b>Figure 105</b> : Comparaison des spectres de masse obtenus par injection directe pour le composé <b>PS11</b> (0,5 mg/mL dans $\text{CH}_3\text{OH}$ 100%) en ESI, mode négatif (A) et mode positif (B). ....	168
<b>Figure 106</b> : Chemin de fragmentation hypothétique proposé pour les composés étudiés en fonction de la nature des substituants $\text{R}_1$ et $\text{R}_2$ et sur la base des spectres de masses obtenus en analyses HRESI(+)-MS séquentielles, en injection directe à partir de l'ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .....	174
<b>Figure 107</b> : Comparaison des chromatogrammes ( $\lambda=285$ nm) obtenus pour une fraction de <i>P. spiralis</i> enrichie en STLs.....	175
<b>Figure 108</b> : Chromatogrammes PDA (total scan) (a) et traces ioniques des ions caractéristiques obtenus en full-MS $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (b) et $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (c), pour chaque composé. ....	177
<b>Figure 109</b> : Chromatogrammes des composés <b>PS15</b> et <b>PS16</b> en conditions de phase mobile acide et non acide.....	179
<b>Figure 110</b> : Chromatogrammes du composé <b>PS16</b> , repurifié par HPLC semi-préparative, en conditions de phase mobile acide et non acide. ....	180
<b>Figure 111</b> : Mutarotation possible au niveau du carbone hémiacétalique pouvant expliquer l'éventuelle épimérisation des composés.....	180

<b>Figure 112</b> : Chemin de fragmentation hypothétique proposé pour le noyau hirsutinolide des composés isolés sur la base des spectres de masses obtenus en analyses UHPLC-HRESI(+)-MS/MS à partir de l'ion $[MH-H_2O]^+$ .....	183
<b>Figure 113</b> : Déréplication de la fraction méthanolique <b>D4</b> .....	186
<b>Figure 114</b> : Chromatogramme de la fraction <b>D4</b> ( $\lambda = 285$ nm) .....	190
<b>Figure 115</b> : Structures proposées pour les composés <b>X</b> (à gauche) et <b>Y</b> (à droite) détectés dans la fraction méthanolique <b>D4</b> .....	191
<b>Figure 116</b> : Pourcentage de viabilité des monocytes humains dérivés en macrophages (par rapport au témoin négatif), après 24 h d'incubation en présence de différentes concentrations ( $\mu$ M) des composés <b>PS11</b> et <b>PS13</b> .....	196
<b>Figure 117</b> : Effets des composés <b>PS11</b> et <b>PS13</b> sur les niveaux d'expression des ARNm de gènes cibles (Nrf2, HO-1, PPAR $\gamma$ et CD36) au sein de monocytes humains.....	197
<b>Figure 118</b> : Effets du composé <b>PS11</b> et <b>PS13</b> sur les niveaux d'expression des ARNm de gènes cibles (Nrf2, HO-1, PPAR $\gamma$ et CD36) au sein de monocytes humains différenciés en macrophages après 48 h en présence de M-CSF. ....	199
<b>Figure 119</b> : Exemple de nuages cellulaires obtenus par cytométrie de flux, sans marquage pour le composé <b>PS11</b> (6,3 nM) (A). Fenêtre du nuage de point correspondant aux monocytes (B) et intensité de la fluorescence des récepteurs CD36 marqués au fluorochrome obtenue pour le composé <b>PS11</b> (C).....	201
<b>Figure 120</b> : Intensité de fluorescence du récepteur CD36 marqué au fluorochrome en fonction des différentes concentrations en composés <b>PS11</b> et <b>PS13</b> .....	202
<b>Figure 121</b> : Exemple de dérivés amino de STLs formés par Woods <i>et al.</i> .....	206
<b>Figure 122</b> : Nature hormétique du facteur de transcription Nrf2 (figure issue de Kumar <i>et al.</i> , 2014) .....	208
<b>Figure 123</b> : Structures des STLs isolées de <i>Tithonia diversifolia</i> , Asteraceae (Lin, 2012).209	
<b>Figure 124</b> : Mécanisme d'addition de Michael proposé pour les hirsutinolides .....	210

## ➤ TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Position taxonomique de la famille des Asteraceae selon Cronquist (1988) .....	51
<b>Tableau 2</b> : Position taxonomique de la famille des Asteraceae selon APG III (2009) .....	51
<b>Tableau 3</b> : Les douze sous-familles de la famille des Asteraceae d'après APweb (source : « Angiosperm Phylogeny Website », 2014) .....	52
<b>Tableau 4</b> : Classification du genre <i>Pseudelephantopus</i> (The Angiosperm Phylogeny Group, 2009 ; Robinson et Smithsonian Institution, 1999) .....	56
<b>Tableau 5</b> : Molécules isolées de l'espèce <i>Pseudelephantopus spicatus</i> d'après la littérature .....	65
<b>Tableau 6</b> : Composés isolés de <i>P. spicatus</i> (A) et <i>P. spiralis</i> (B) d'après un travail de compilation d'informations publié par Bohlman et Jakupovic (1990).....	69
<b>Tableau 7</b> : Activités leishmanicides des extraits des différentes parties de <i>P. spiralis</i> issus des deux premières collectes ( <b>lots A et B</b> ).....	94
<b>Tableau 8</b> : Activités biologiques des extraits aqueux et éthanolique issus des parties aériennes du <b>lot E</b> .....	95

<b>Tableau 9</b> : Évaluation de l'activité leishmanicide <i>in vitro</i> des différents extraits issus des lots A et B sur modèle amastigote axénique de <i>L. amazonensis</i> .	96
<b>Tableau 10</b> : Activités leishmanicides des fractions issues de A1 sur amastigotes axéniques de <i>L. infantum</i> (IC <sub>50</sub> ) et leurs cytotoxicités sur la lignée VERO (CC <sub>50</sub> ).	100
<b>Tableau 11</b> : Tableau récapitulatif des composés isolés des parties aériennes de <i>P. spiralis</i>	114
<b>Tableau 12</b> : Déplacements chimiques moyens $\delta_H$ observés pour les deux formes A et B des composés PS15, PS16 et PS17, dans CD <sub>3</sub> OD, comparés aux $\delta_H$ moyens obtenus dans CDCl <sub>3</sub>	161
<b>Tableau 13</b> : Proportions des deux formes A et B (en %) établies d'après la moyenne des aires des signaux <sup>1</sup> H obtenus dans CD <sub>3</sub> OD.	161
<b>Tableau 14</b> : Déplacements chimiques moyens $\delta_C$ observés pour les deux formes A et B des composés du PS15, PS16 et PS17, dans CD <sub>3</sub> OD, comparés aux $\delta_C$ moyens obtenus dans CDCl <sub>3</sub> .	162
<b>Tableau 15</b> : Analyses des composés par injection directe en full-HRMS-ESI(+).	169
<b>Tableau 16</b> : Analyses HRMS-ESI(+)-MS <sup>2</sup> des composés par introduction directe	171
<b>Tableau 17</b> : Analyses HRMS-ESI(+)-MS <sup>3</sup> et MS <sup>4</sup> des composés par introduction directe	172
<b>Tableau 18</b> : Ions diagnostiques observés pour les hirsutinolides étudiés selon la nature de leurs substituants R <sub>1</sub> et R <sub>2</sub> .	173
<b>Tableau 19</b> : Comparaison des proportions relatives des pics chromatographiques a et b pour les composés PS15 et PS16, avec les résultats obtenus pour les formes A et B présentes dans le CD <sub>3</sub> OD, en RMN <sup>1</sup> H.	179
<b>Tableau 20</b> : Ions [M+Na] <sup>+</sup> et [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> obtenus en full-MS pour les composés analysés par UHPLC-HR ESI(+)-MS.	181
<b>Tableau 21</b> : Ions diagnostiques observés pour les hirsutinolides étudiés selon la nature de leurs substituants R <sub>1</sub> et R <sub>2</sub> .	182
<b>Tableau 22</b> : Ions majoritaires produits à partir des analyses MS <sup>2</sup> réalisées sur l'ion de m/z [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> et des principaux ions fragments formés dans la source, par UHPLC-HRESI(+)-MS/MS	184
<b>Tableau 23</b> : Analyses des composés en full-MS par UHPLC-HR ESI(+)-MS.	185
<b>Tableau 24</b> : Molécules détectées suite à la déréplication de la fraction D4 par UHPLC-DAD-HRMS-ESI(+)-MS/MS	187
<b>Tableau 25</b> : Activités antipaludiques des molécules testées et cytotoxicité sur lignées cellulaires saines VERO.	193
<b>Tableau 26</b> : Activités leishmanicides des molécules testées et cytotoxicité sur macrophages murins	194
<b>Tableau 27</b> : Activités biologiques des composés isolés de <i>P. spiralis</i> sur différentes lignées cellulaires, publiées dans la littérature	205
<b>Tableau 28</b> : Séquences des amorces utilisées en PCR quantitative.	237

## **- INTRODUCTION -**



Les maladies tropicales constituent de nos jours un fléau mondial de santé publique. En 2013, le paludisme a été à l'origine de près de 198 millions de cas dans le monde et la cause de 584 000 décès (source : « WHO | Malaria Fact sheet N°94 » 2014). Les maladies tropicales dites « négligées » touchent les populations les plus démunies de la planète, affectant près de 1,4 milliard de personnes dans 149 pays (source : « WHO | Neglected tropical diseases » 2015). L'une d'entre elles, la leishmaniose, est une parasitose causant près de 1,3 million de nouveaux cas par an (source : « WHO | Leishmaniasis Fact sheet N°375 » 2014). Il existe actuellement peu de traitements pour ces pathologies. Ces derniers sont par ailleurs à l'origine de nombreux effets secondaires. Parallèlement, des phénomènes de résistances apparaissent de plus en plus fréquemment, mettant en danger leur efficacité (World Health Organization 2010 ; source : « WHO | Guidelines for the treatment of malaria. Second edition » 2015). La recherche de nouveaux agents thérapeutiques possédant des mécanismes d'actions distincts constitue donc une urgence pour le traitement de ces maladies.

Les molécules susceptibles d'établir des liaisons covalentes avec des cibles biologiques ont longtemps souffert d'un manque d'intérêt et de réticences de la part de l'industrie pharmaceutique, à cause de leur toxicité. Malgré cela, elles représentent 30 % des principes actifs actuellement sur le marché et sont approuvées dans le traitement de nombreuses pathologies (Mah *et al.*, 2014). Pour un certain nombre d'entre elles, le mécanisme d'action impliquant une liaison covalente n'a été élucidé que récemment, après qu'elles ont été utilisées pendant très longtemps en thérapie. Depuis quelques années, cette classe thérapeutique fait l'objet d'un regain d'intérêt de la part de la recherche pharmaceutique. Cela concerne notamment des molécules électrophiles présentant un motif structural « accepteur de Michael ». Ces molécules sont capables d'établir des liaisons covalentes avec des molécules biologiques nucléophiles *via* ce motif et de modifier la réponse de l'organisme. Les systèmes accepteurs de Michael agissent sur de nombreuses cibles biologiques, leur conférant un grand nombre d'indications thérapeutiques. Ils offrent des perspectives particulièrement intéressantes dans les domaines de la cancérologie et de l'inflammation. Ces systèmes présentent également un potentiel antiparasitaire, par inhibition de la croissance des parasites ou bien de façon indirecte en modulant la réponse immunitaire de l'hôte infecté.

De nos jours, les substances naturelles restent une source importante de principes actifs. Les végétaux, notamment, produisent pour leur survie un nombre considérable de métabolites secondaires, d'une très grande diversité structurale, souvent difficile à obtenir par voie de synthèse.

Nous avons recherché au sein du règne végétal des espèces synthétisant des métabolites secondaires présentant un motif accepteur de Michael dans leur structure. Notre unité de recherche dispose d'une antenne de recherche à Lima, au Pérou, ce qui nous a permis d'avoir un accès privilégié à la flore péruvienne, haut lieu de biodiversité. Nous avons identifié, parmi ces familles végétales, les espèces présentes sur le territoire péruvien n'ayant jamais fait l'objet d'études phytochimiques et accessibles à la collecte. Au sein de cette présélection, les espèces utilisées localement (régions du Loreto et secteur d'Azulis) en médecine

traditionnelle ont été privilégiées et des premiers tests de criblage d'activité réalisés. Suite aux premiers résultats obtenus, il a été choisi d'étudier l'espèce *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist, une Asteraceae utilisée en médecine traditionnelle, notamment dans le traitement de l'inflammation et du paludisme. Ce travail porte sur l'étude de sa composition en lactones sesquiterpéniques, métabolites secondaires bioactifs, connus pour comporter dans leur structure des motifs accepteurs de Michael particulièrement réactifs.

L'objectif de ce travail a donc été d'isoler et identifier ces composés puis de tester leurs activités *in vitro* sur différents modèles biologiques. Les molécules isolées ont été testées pour leur action sur la polarisation des macrophages, principalement la promotion de l'expression du récepteur scavenger CD36 à leur surface, *via* la voie Nrf2. Parallèlement, leur potentiel antiparasitaire a été évalué sur plusieurs modèles expérimentaux: l'agent *Plasmodium falciparum*, responsable du paludisme létal chez l'Homme et le parasite *Leishmania infantum* responsable de la leishmaniose viscérale.

Ce travail est divisé en trois parties. Dans une première partie portant sur les travaux bibliographiques antérieurs, nous définirons la notion d'accepteurs de Michael, décrirons leurs réactivités chimiques et biologiques et démontrerons leur intérêt thérapeutique. Il sera ensuite traité des données botaniques, ethnopharmacologiques et phytochimiques de l'espèce étudiée, *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist. Enfin nous étudierons la classe de molécules visées que sont les lactones sesquiterpéniques et leur intérêt biologique. Nous nous attacherons plus particulièrement au sous-type structural des hirsutinolides.

Dans une seconde partie, nous présenterons nos travaux personnels concernant l'isolement ciblé de lactones sesquiterpéniques à partir des parties aériennes de *P. spiralis* et leur élucidation structurale. Une sous-partie sera consacrée à leur analyse en résonance magnétique nucléaire, particulièrement complexe. Il sera aussi question dans cette partie expérimentale de l'étude de la fragmentation de lactones sesquiterpéniques de types hirsutinolides par analyses de spectrométrie de masse haute résolution et de fragmentations séquentielles. Une méthode de détection par UHPLC-DAD-MS/MS sera développée et appliquée à la déréplication d'un extrait. Enfin les résultats des tests biologiques effectués sur différents modèles cellulaires seront présentés, analysés et le potentiel antiparasitaire des molécules isolées sera discuté.

Finalement nous conclurons l'ensemble de ce travail de recherche par une troisième et dernière partie et clorons cette étude en exposant les différentes perspectives envisageables.



## **Partie A - TRAVAUX ANTÉRIEURS -**



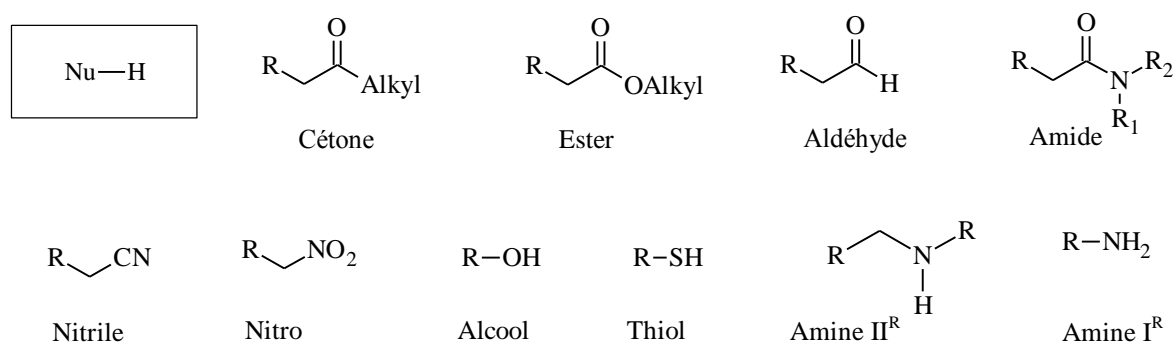
## I. Molécules électrophiles de type « Accepteurs de Michael »

Une molécule électrophile est un composé possédant un ou plusieurs atome(s) déficitaire(s) en électrons. Elle a la capacité de former une liaison avec un composé dit « nucléophile » qui lui cèdera son doublet d'électrons. Les électrophiles sont des espèces réactives qui vont être capables de moduler certaines fonctions biologiques en interagissant avec des macromolécules nucléophiles. Ces interactions conduisent à des activités biologiques diverses présentant un intérêt en thérapeutique. Il existe un certain nombre de molécules ou motifs électrophiles, mais l'objet de ce travail de recherche a porté sur une classe d'agents thérapeutiques particulièrement prometteurs : les « accepteurs de Michael ».

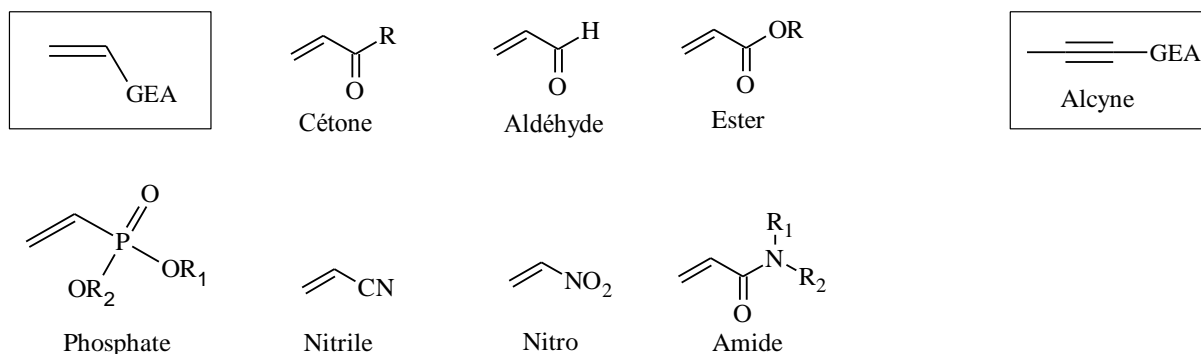
Après avoir défini le concept « d'accepteur de Michael » et expliqué les réactivités chimiques puis biologiques de ces composés, cette première partie décrira les différentes cibles biologiques identifiées. Leur portée clinique sera, lorsque possible, illustrée par des molécules actuellement sur le marché, ou en voie de développement. À partir de cet état des lieux, le potentiel des accepteurs de Michael en tant qu'agents antiparasitaires sera discuté.

### I. 1. « Accepteur de Michael » : définition

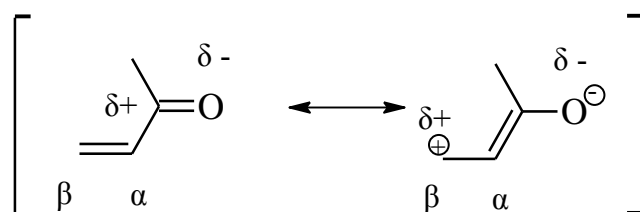
La réaction d'addition dite « de Michael » est une addition nucléophile conjuguée entre un donneur de Michael, nucléophile, et un électrophile  $\alpha,\beta$ -insaturé ou « accepteur de Michael ». Une liaison est alors établie entre les deux espèces. Les donneurs de Michael sont des hétéroatomes porteurs d'un doublet libre (**Figure 1**) tels que les thiols, les anions ou les amines. Les accepteurs de Michael (AM), quant à eux, sont des motifs présentant une double liaison, ou une fonction alcyne, en position  $\alpha$  et  $\beta$  d'un groupement électroattracteur (GEA) tels que les fonctions carbonylées, les amides ou les nitriles (**Figure 2**).



**Figure 1** : Systèmes donneurs de Michael (Rabasso, 2006)

**Figure 2 :** Systèmes accepteurs de Michael (Rabasso, 2006)

La réaction de Michael est un cas de vinylogie dont le principe est que « la propriété d'un groupe fonctionnel s'exprime (ou est relayée) à travers une (ou plusieurs) double(s) liaison(s), c'est-à-dire un (des) vinyle(s) »<sup>1</sup>. Dans le cas des accepteurs de Michael, ce principe peut être visualisé grâce à la **Figure 3** représentant un système carbonyle  $\alpha,\beta$ -insaturé, motif régulièrement utilisé pour illustrer les accepteurs de Michael. La **Figure 3** montre la polarisation de la fonction carbonyle relayée le long de la double liaison par résonance. Dans le cas des dérivés carbonylés  $\alpha,\beta$ -éthyléniques, il existe donc deux sites électrophiles au sein de la molécule pouvant donner lieu à deux réactions d'additions, en compétition.

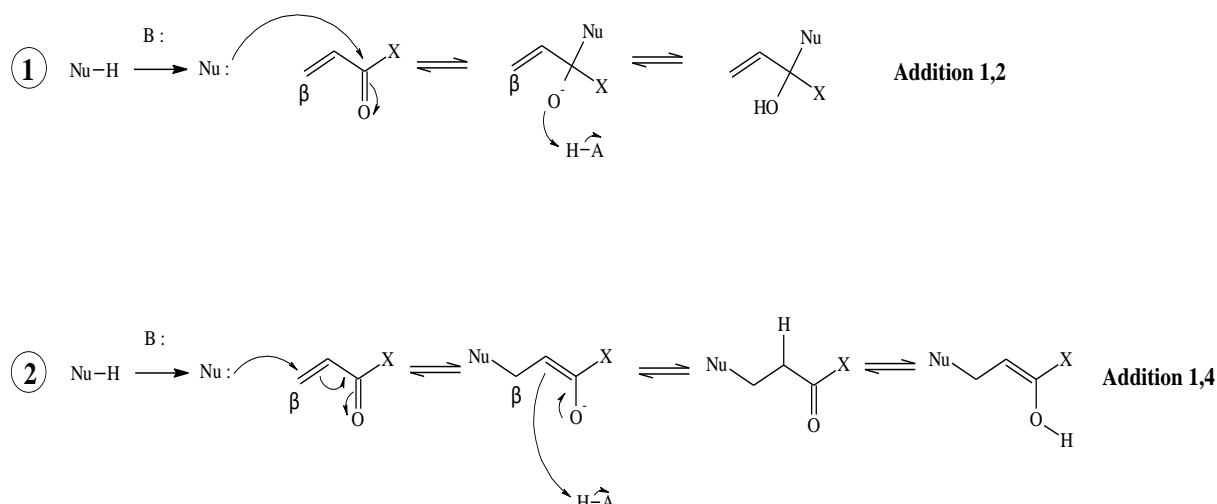


Accepteurs de Michael

**Figure 3 :** Principe de vinylogie appliqué à une cétone  $\alpha,\beta$ -insaturée

En théorie, un nucléophile peut en effet attaquer soit directement le carbone de la fonction carbonyle, soit le carbone en  $\beta$ , rendu électrophile par mésomérie. L'attaque du carbonyle est une addition directe de type 1,2 (réaction 1, **Figure 4**), alors que celle ayant lieu au niveau du carbone en  $\beta$  est une addition conjuguée, dite addition 1,4 ou encore addition de Michael (réaction 2, **Figure 4**). Selon les conditions, l'une ou l'autre des additions peut être favorisée.

<sup>1</sup> Définition issue du cours de Pharmacognosie du Professeur J. Vercauteren, 3<sup>ème</sup> année de Pharmacie



**Figure 4 :** Mécanismes d'additions nucléophiles sur un système conjugué

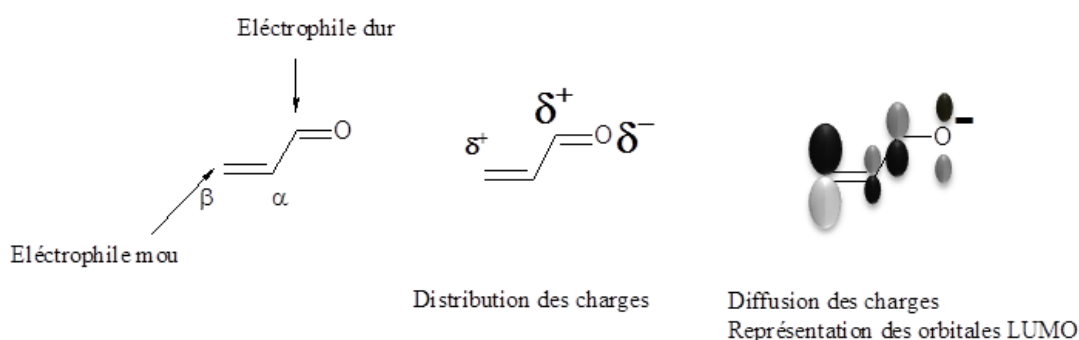
## I. 2. Réactivité chimique

Du point de vue chimique, la position préférentielle de l'addition nucléophile dépend de trois éléments (Clayden *et al.*, 2002) :

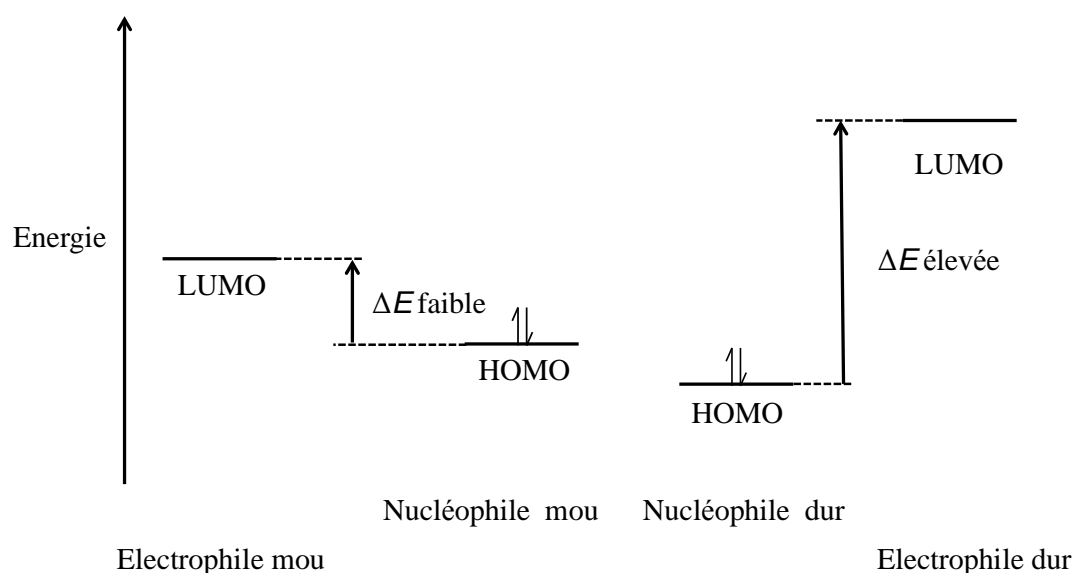
- la nature du nucléophile
- la nature du groupement électroattracteur et l'encombrement stérique généré
- les conditions de la réaction

Le premier grand principe expliquant la sélectivité de l'addition nucléophile est la théorie HSAB (Hard and Soft Acids and Bases) ou concept de Pearson, qui se base sur les caractères « mou » ou « dur » du nucléophile et de l'électrophile entrant en jeu dans la réaction. Le principe HSAB explique que les additions d'un nucléophile dur sur un électrophile dur, ou d'un nucléophile mou avec un électrophile mou, seront plus rapides que celles entre espèces de caractères opposés. Elles seront donc très favorisées. Un électrophile ou nucléophile est dit « mou » lorsqu'il est volumineux, neutre ou faiblement chargé, et facilement polarisable, c'est-à-dire que sa charge est dispersée. Inversement un nucléophile ou un électrophile est dit « dur » lorsqu'il est de petite taille, qu'il possède une forte charge et est faiblement polarisable, c'est-à-dire que cette charge est très localisée (**Figure 5**) (Fleming, 2011).

Les interactions dures font donc intervenir les charges et les caractères électrostatiques des espèces concernées, alors que les interactions molles sont des interactions orbitales (Clayden *et al.*, 2002). Le carbone en  $\beta$  étant un électrophile mou (**Figure 5**), l'addition de Michael ou addition 1,4 est définie comme une interaction molle faisant donc intervenir les orbitales. Elle est favorisée lorsque la différence des niveaux d'énergie entre les orbitales LUMO de l'électrophile et HOMO du nucléophile est faible (Johansson, 2012), c'est-à-dire que le nucléophile mou possède une HOMO de haute énergie et l'électrophile mou, une LUMO de basse énergie (**Figure 6**) (Bélanger, 2014).



**Figure 5 :** Charges et polarisation d'un système carbonyle  $\alpha,\beta$ -insaturé. Dans le cas présenté, le carbone du carbonyle est un électrophile dur, car fortement chargé et peu polarisable. Le carbone en  $\beta$  est un électrophile mou, car il est peu chargé, mais sa charge est diffuse<sup>2</sup>.



**Figure 6 :** Niveaux d'interactions orbitales entre espèces molles et dures, selon le principe HSAB (Scudder, 2013)

Ces règles régissent la réactivité des espèces molles et dures entre elles en dehors de toutes considérations d'encombrement, de compétition et d'autres phénomènes physico-chimiques pouvant intervenir entre deux molécules. Un exemple classique de la régiosélectivité de

<sup>2</sup> Schéma inspiré du cours de Chimie Organique du Professeur C. Bélanger, Département de chimie de la Faculté des sciences de l'Université de Sherbrooke, Canada (Bélanger, 2014) et d'un chapitre du cours en accès libre « OC VI : advanced Methods and Strategies in Organic Chemistry » du Professeur J.W Bode, ETH-Zürich (Bode, 2013)

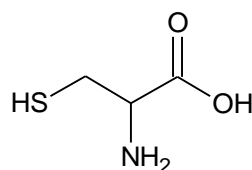
l'attaque sur une cétone  $\alpha,\beta$ -insaturée, conditionnée par la nature dure ou molle de l'électrophile, est la différence de réactivité d'un organolithien (dur) et d'un cuprate (mou).

En pratique, cela est plus complexe. La réactivité de l'électrophile  $\alpha,\beta$ -insaturé dépendra de la nature du ou des nucléophile(s) présent(s) ainsi que de la nature du groupement électroattracteur, mais aussi de l'encombrement stérique généré (Amslinger, 2010). Le carbone du carbonyle étant un électrophile dur (**Figure 5**) il est susceptible de réagir en présence d'un nucléophile dur par une addition 1,2. La nature du GEA et l'encombrement stérique qu'il génère peuvent favoriser dans certains cas une addition 1,2. À titre d'exemple, le carbone carbonylé d'un aldéhyde  $\alpha,\beta$ -insaturé étant moins encombré que celui d'une cétone, la molécule aura tendance à subir préférentiellement des réactions d'additions directes.

La réactivité dépend aussi des conditions de réaction, de la présence de plusieurs nucléophiles en compétition. Ainsi la sélectivité de l'addition 1,2 ou 1,4 dépend du contrôle cinétique ou thermodynamique de la réaction. Sous contrôle cinétique, l'addition favorisée est celle qui a la constante cinétique la plus rapide. Il s'agit souvent de l'addition 1,2, plus rapide, mais donnant un produit moins stable. Le contrôle cinétique intervient à température basse, avec des temps de réaction courts, dans un milieu aprotique et en présence d'une base forte. Dans le cas où le nucléophile est un bon groupe partant, l'addition 1,2 peut être réversible. Par ailleurs, l'adduit conjugué (ou de Michael) se forme également, parallèlement, mais plus lentement. Il devient l'espèce persistante en fin de réaction (Brown *et al.*, 2010 ; Clayden *et al.*, 2002). Inversement, un contrôle thermodynamique favorise l'addition conjuguée, moins rapide, mais formant l'adduit en  $\beta$  généralement plus stable. Les conditions impliquant un contrôle thermodynamique sont des conditions dites équilibrantes : une température élevée, la présence d'une base faible ou en défaut et un temps de réaction long. Dans ces conditions, l'ensemble des étapes de l'addition de Michael est potentiellement réversible, c'est-à-dire que le nucléophile peut être éliminé, régénérant l'accepteur (Johansson, 2012). Parfois le produit peut être stabilisé par des facteurs extérieurs et persister. Bien que le caractère nucléophile du donneur de Michael soit amélioré en milieu basique, il a été démontré que l'addition conjuguée peut également se produire en catalyse acide. La vitesse de réaction est alors remarquablement augmentée (Mulliner *et al.*, 2011).

### I. 3. Réactivité biologique

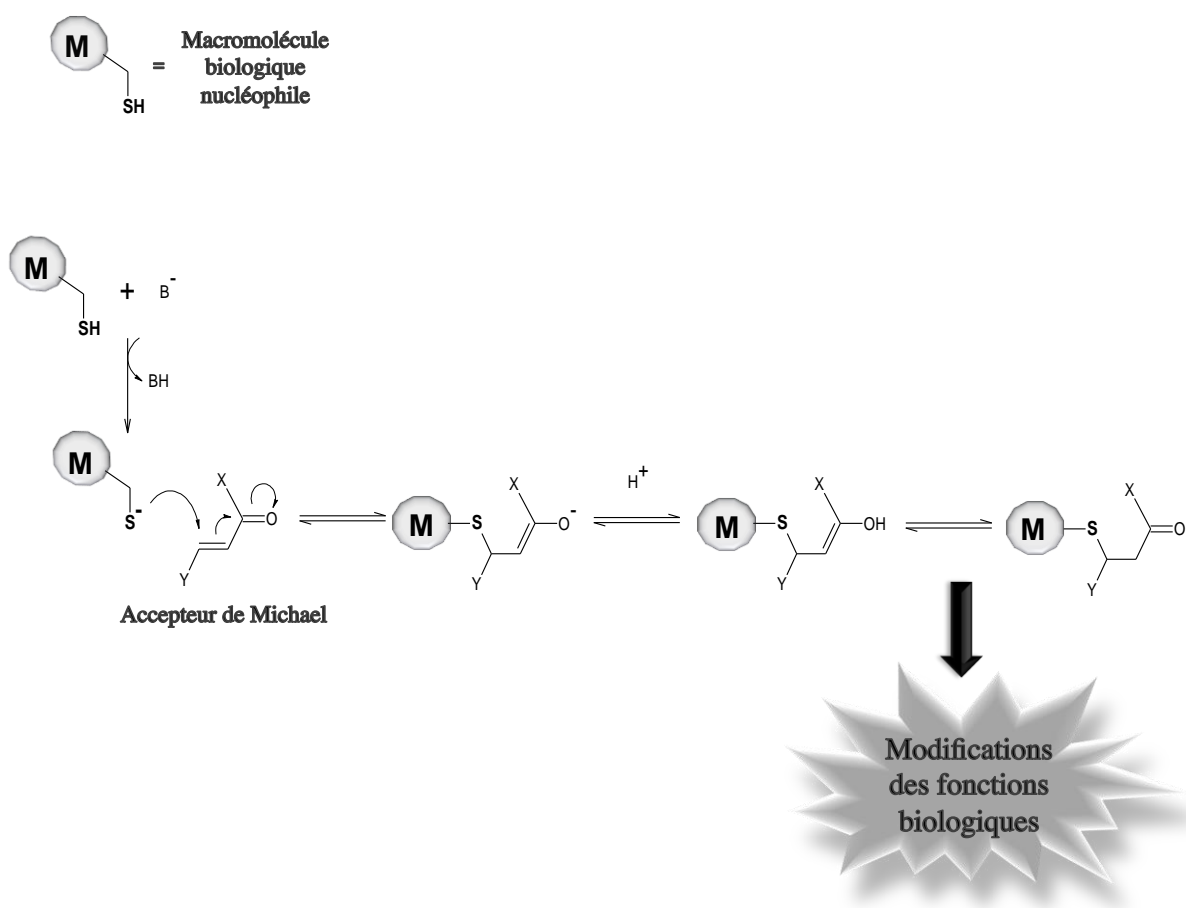
Bien qu'il soit difficile d'établir des généralités, le principe HSAB permet de comprendre et de prédire dans une certaine mesure, la réactivité privilégiée des systèmes accepteurs de Michael avec de nombreuses molécules biologiques nucléophiles. En effet de nombreuses protéines sont susceptibles d'interagir avec des AM au niveau de leurs acides aminés nucléophiles. C'est le cas notamment des groupes sulfhydryles des résidus cystéines (**Figure 7**), de l'amine primaire et du groupement  $\varepsilon$ -amino de la lysine, ou encore de l'amine secondaire de l'imidazole de l'histidine (LoPachin *et al.*, 2012).



**Figure 7 :** Structure de la cystéine.

Le caractère nucléophile mou de cet acide aminé est dû à sa fonction sulfhydryle terminale.

Il a été démontré que les AM étaient plus enclins à réagir avec les groupements sulfhydryles des molécules qu'avec les groupements amines (**Figure 8**). Ceci s'explique par le fait que les thiols sont des nucléophiles plus mous que les groupements amines (LoPachin *et al.*, 2012). Les résidus cystéines sont donc des cibles importantes des AM. L'un des problèmes posés par ce mécanisme d'action est qu'il est *a priori* non spécifique et peut conduire à des phénomènes de toxicité (Mulliner *et al.*, 2011).



**Figure 8 :** Mécanisme d'addition entre accepteurs de Michael et macromolécules biologiques nucléophiles présentant un groupe thiol (Johansson, 2012)

La réaction avec les biomolécules peut également, dans certains cas, être stabilisée par des facteurs extérieurs (Johansson, 2012), comme des liaisons hydrogènes intermoléculaires entre



l'AM et la cystéine (Amorim *et al.*, 2013), et devenir irréversible. Certains AM ont été identifiés comme potentiellement génotoxiques agissant comme des agents alkylants de l'ADN.

Néanmoins de nombreuses molécules, dont l'addition de Michael correspond au mécanisme d'action, ont déjà prouvé leur intérêt médicinal ou sont en cours d'essai clinique. Les interactions, irréversibles ou non, avec les résidus cystéines, notamment au niveau des sites enzymatiques, sont à l'origine de nombreux effets thérapeutiques.

## I. 4. Cibles biologiques des Accepteurs de Michael

### I. 4.1. Protéases à cystéine

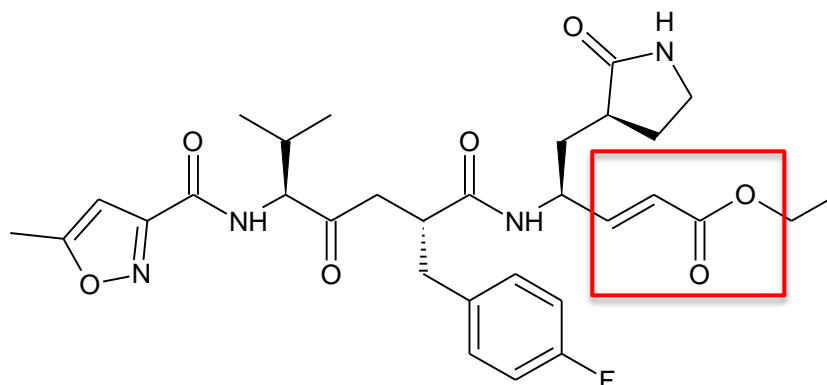
Certains accepteurs de Michael sont des inhibiteurs irréversibles de protéases à cystéine, enzymes intervenant dans la dégradation des protéines. Ces enzymes possèdent un résidu cystéine au sein de leur site actif et sont donc de bons nucléophiles. Elles constituent des cibles thérapeutiques intéressantes du fait de leur présence ubiquitaire au sein des protozoaires, des helminthes, des virus, des bactéries, mais aussi des mammifères (Sajid et McKerrow, 2002 ; Ghosh et Gemma, 2014). Chez l'Homme, leur dérégulation est liée à de nombreuses maladies cardiovasculaires, inflammatoires, neurologiques et immunologiques (Ghosh et Gemma, 2014). Le mécanisme d'action passe par une addition de Michael de l'électrophile au niveau du site actif cystéine de l'enzyme (Santos et Moreira, 2007).

Les protéases à cystéine peuvent servir de cibles privilégiées dans le développement d'agents antiviraux, notamment les protéases 3C indispensables à la réplication virale des rhinovirus humains (Tan *et al.*, 2013). Le **Rupintrivir (AG7088)** (parfois écrit « Ruprintivir » ou « Rupintrivir » dans la littérature) est un exemple d'agent antiviral inhibiteur de la protéase C3 (**Figure 9**). La molécule agit par addition de Michael au niveau d'un résidu cystéine de la protéase (Tan *et al.*, 2013). Le développement du **Rupintrivir** s'est arrêté en phase II à cause de son efficacité limitée dans la prévention et le traitement du rhume simple.

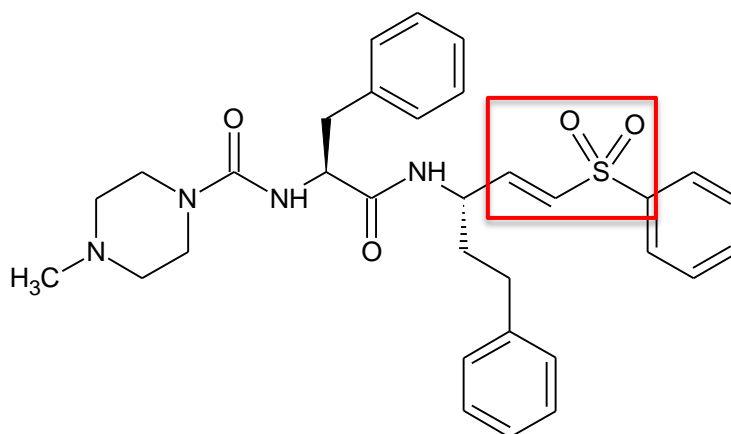
Certaines protéases à cystéine sont également indispensables à la survie d'agents pathogènes et constituent d'excellentes cibles à visée antiparasitaire chez l'agent du paludisme *Plasmodium falciparum* et les Trypanosomes. Parmi celles-ci se trouvent la cruzaine de l'agent *Trypanosoma cruzi*, responsable de la maladie de Chagas ; la falcipaine présente chez *P. falciparum* ; ou encore la rhodesaine, présente chez *Trypanosoma brucei*, l'agent de la maladie du sommeil (Santos et Moreira, 2007 ; Breuning *et al.*, 2010). À titre d'exemple peut être cité le cas du composé **K11777** ou **K777**, de type vinyle sulfone (**Figure 10**). Cette molécule a été identifiée à l'Université de California San Francisco et est actuellement autorisée pour des essais cliniques en phase I par la FDA aux États-Unis, pour le traitement de la maladie de Chagas (Jäger *et al.*, 2013). Cette molécule s'est montrée efficace contre différentes souches de *Trypanosoma cruzi*, y compris des souches résistantes aux traitements de référence de la maladie, le benznidazole et le nifurtimox. Le composé **K777** inhibe

sélectivement la cruzaine en se fixant de façon irréversible au résidu thiol du site catalytique Cyst25 de l'enzyme par addition de Michael (Götz et James, 2008 ; Lee *et al.*, 2012).

De nombreux dérivés peptidiques et peptidomimétiques possédant un système accepteur de Michael de type vinyle sulfone ou une fonction carbonylée  $\alpha,\beta$ -insaturée ont donc été développés en thérapeutique comme inhibiteurs des protéases à cystéines (Ghosh et Gemma, 2014).



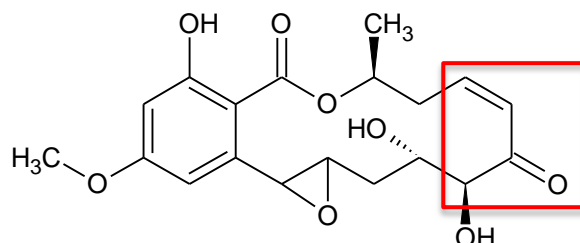
**Figure 9 :** Structure du **Rupintrivir**, agent antiviral inhibiteur de la protéase C3



**Figure 10 :** Structure de la molécule **K11777** ou **K777**, un inhibiteur sélectif de la cruzaine chez *Trypanosoma cruzi*.

## I. 4.2. Protéines kinases

Les accepteurs de Michael présentent également un très grand intérêt en tant qu'inhibiteurs irréversibles d'un autre type d'enzymes, les protéines kinases et plus particulièrement des tyrosines kinases. Les protéines sont impliquées dans de nombreux mécanismes physiologiques, et leur dysfonctionnement peut conduire à des pathologies allant de l'inflammation au cancer (Carmi *et al.*, 2012 ; Schirmer *et al.*, 2006). Les AM ont la capacité d'établir des liaisons covalentes avec des résidus cystéines du site non catalytique de l'enzyme. Actuellement ce mécanisme d'action fait l'objet d'un regain d'intérêt en thérapeutique, notamment en cancérologie et il conduit non seulement à la recherche de motifs structuraux AM originaux, mais aussi de nouvelles cibles potentielles, parmi les kinases. Cet engouement thérapeutique pour les inhibiteurs de kinases a aussi donné lieu à la découverte d'une nouvelle classe d'agents antiparasitaires potentielle puisque de nombreuses kinases ont été identifiées chez le genre *Plasmodium* (Artz *et al.*, 2013) et la famille des Trypanosomatidés (*Leishmania*, *Trypanosoma*) (Miller et Taunton, 2014) comme cibles biologiques prometteuses. Un polycétide naturel issu d'un champignon, la hypothémicine (**Figure 11**), a présenté une excellente activité sur l'agent *T. brucei*, chez lequel il inhibe 10 des 21 CDXG<sup>3</sup> kinases identifiées (Merritt *et al.*, 2014 ; Nishino *et al.*, 2013 ; Miller et Taunton, 2014). Cette molécule agit par addition de Michael au niveau du groupement cystéine des kinases CDXG (Schirmer *et al.*, 2006).

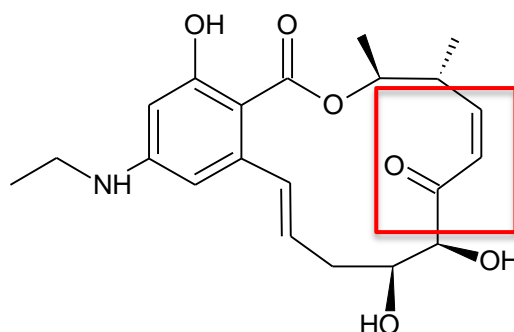


**Figure 11** : Structure de la hypothémicine, inhibiteur de kinases de *Trypanosoma brucei*

De nombreuses autres kinases ont été identifiées chez l'Homme comme cibles des AM. Les kinases impliquées dans les voies de régulations vitales des MAPs (Mitogen-Activated Protein) (Morrison, 2012) peuvent être inhibées à plusieurs niveaux de la cascade de signalisation (Schirmer *et al.*, 2006 ; Xu *et al.*, 2013). La protéine Kinase B AKT est un autre exemple (Nguyen *et al.*, 2014).

Actuellement le **composé E6201** est en développement clinique dans le traitement des tumeurs solides et du psoriasis (**Figure 12**). Il agit comme inhibiteur compétitif au niveau du site de liaison à l'ATP des kinases MEK, par addition de Michael. **E6201** est dérivé d'un composé naturel (Shen *et al.*, 2010 ; Narita *et al.*, 2014).

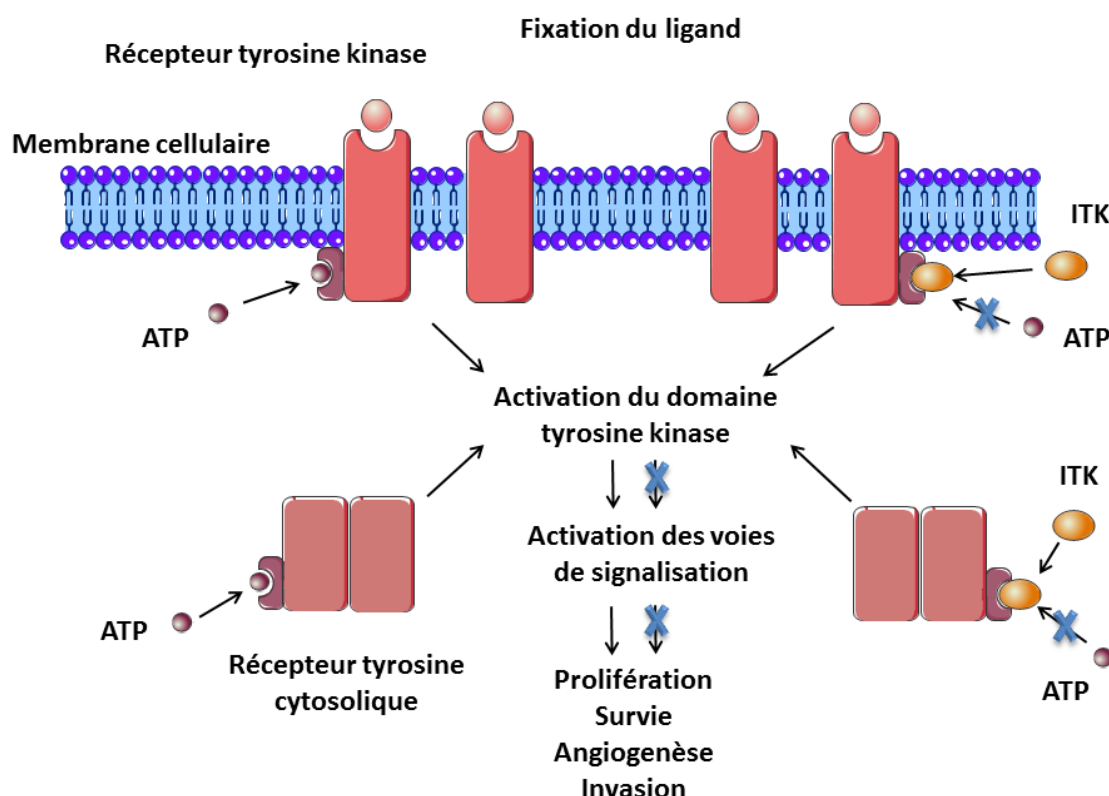
<sup>3</sup> Les kinases CDXG sont nommées ainsi car elles possèdent dans leur séquence d'acides aminés le motif actif Cys-Asp-Xaa-Gly (Nishino *et al.*, 2013).



**Figure 12** : Structure du composé **E6201**, inhibiteur compétitif du site de liaison à l'ATP des kinases MEK

Le grand groupe des tyrosines kinases, plus spécifiquement, est une autre cible très importante des AM. Ces enzymes, intracellulaires ou intramembranaires, catalysent la phosphorylation des protéines en transférant une molécule d'ATP vers des protéines effectrices. Elles jouent ainsi un rôle majeur dans la signalisation cellulaire (**Figure 13**) (Schwartz *et al.*, 2014). Le développement d'inhibiteurs irréversibles des tyrosines kinases est actuellement l'une des voies de recherche dans la lutte contre le cancer (**Figure 13**) (Merlin, 2008)

À titre d'exemple, les AM peuvent se lier de façon irréversible à un résidu cystéine nucléophile de la protéine EGFR, récepteur du facteur de croissance épidermique (Schwartz *et al.*, 2014). De nombreuses molécules possédant ce mécanisme d'action sont actuellement en développement ou déjà sur le marché (Dacomitinib, PF-00299804, Neratinib, HKI-272, BIBW-2992) (Schwartz *et al.*, 2014). L'une d'entre elles, l'**Afatinib** (**Giotrif®**, Boehringer Ingelheim International GmbH®), est actuellement sur le marché pour le traitement du cancer bronchique non à petites cellules. Il possède au sein de sa structure un motif acrylamide et se lie de façon covalente à la protéine EGFR par addition de Michael (Carmi *et al.*, 2012). Une autre molécule, le **Neratinib** (Puma Biotechnology, Inc.®), est un inhibiteur sélectif et irréversible de HER2, récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2. Il est indiqué dans le cancer du sein positif au HER2 (Carmi *et al.*, 2012). Il est actuellement à différents stades de développement clinique, seul ou en association avec d'autres molécules anticancéreuses (Lavaud et Andre, 2014 ; source : « Clinical Trials : Neratinib », 2014).



**Figure 13 :** Rôle cellulaire des tyrosines kinases dans la cancérogenèse.

Les inhibiteurs des tyrosines kinases (ITK) se lient de façon irréversible au site non catalytique de l'enzyme, empêchant la fixation de l'ATP. L'enzyme n'est alors plus capable de remplir sa fonction de phosphorylation des protéines (Schéma inspiré de Merlin, 2008).

Une autre tyrosine kinase cible des AM, la tyrosine kinase de Bruton, est une enzyme importante dans le développement des lymphocytes B (Mohamed *et al.*, 2009). L'**Ibrutinib**, un inhibiteur covalent et irréversible de la tyrosine kinase de Bruton développé par Janssen-Cilag®, est une molécule présentant un motif acrylamide au sein de sa structure (Mohamed *et al.*, 2009). Le principe actif se lie à des résidus cystéines au niveau du site de liaison de l'ATP de l'enzyme, par addition de Michael (Carmi *et al.*, 2012). La molécule possède actuellement une ATU (Autorisation Temporaire d'Utilisation) de cohorte délivrée par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé), pour deux indications dans le traitement des lymphomes à cellules du manteau et lymphocytaire, ainsi que le traitement de la leucémie lymphoïde chronique (source : « ANSM : Ibrutinib », 2014).

Les récepteurs des facteurs de croissance des fibroblastes FGFR pourraient également être une cible intéressante de systèmes AM (Liang *et al.*, 2013).

### I. 4.3. Autres cibles enzymatiques

Il existe de nombreuses autres cibles potentielles des accepteurs de Michael, au niveau enzymatique. Le **Finastéride**, un inhibiteur de la 5- $\alpha$ -réductase utilisé dans le traitement de

l'hyperplasie bénigne de la prostate possède un mécanisme d'action faisant intervenir une addition de Michael (Potashman et Duggan, 2009). La **Sélégiline**, utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson inhibe de façon irréversible la MAO-B (Monoamine Oxidase de type B), permettant ainsi de bloquer sa fonction de dégradation de la dopamine et donc de réguler son taux. Deux mécanismes d'actions ont été proposés et font tous deux intervenir des adduits de Michael (Potashman et Duggan, 2009). La lipase des monoglycérides (MGL) est également inhibée efficacement et sélectivement par des AM de type maléimides N-substitués (Matuszak *et al.*, 2009).

#### I. 4.4. Systèmes REDOX

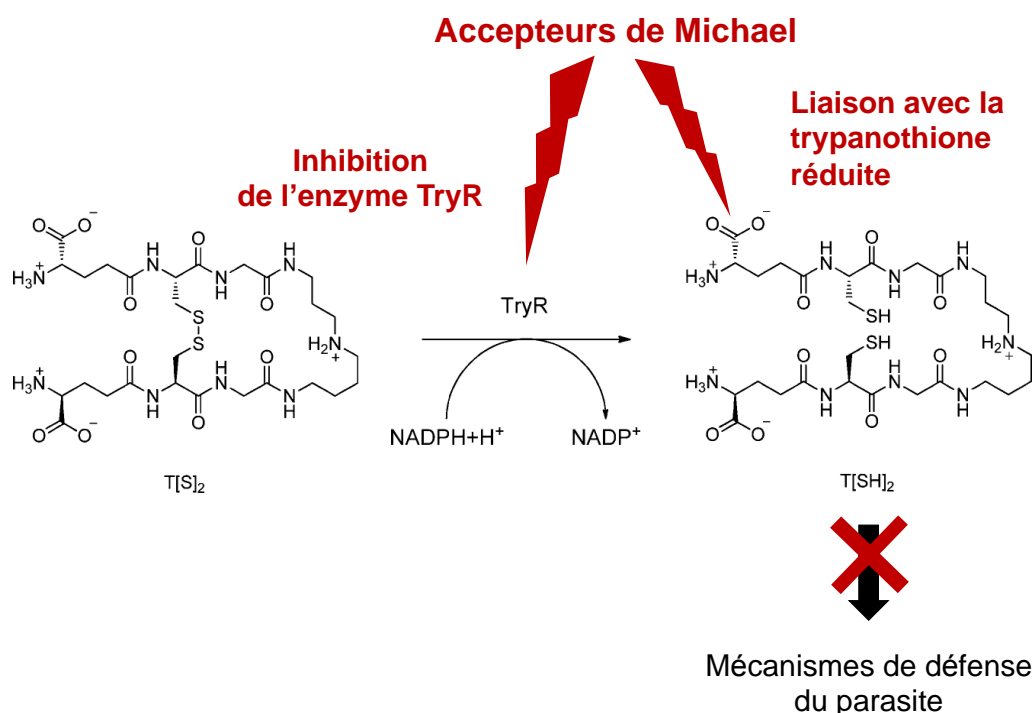
Les accepteurs de Michael interviennent également au niveau des systèmes de régulation du métabolisme redox cellulaire des mammifères ou bien des parasites.

Ils agissent tout d'abord au niveau du système thiorédoxyne, par inhibition de la thiorédoxyne réductase (Gan *et al.*, 2013 ; Cai *et al.*, 2012). Ce système est impliqué dans des fonctions aussi indispensables que la réparation de l'ADN, la régulation des facteurs de transcription, la réponse immunitaire, l'infection virale... (Lu et Holmgren, 2014).

Une autre cible potentielle des AM est le système antioxydant du glutathion, un tripeptide présentant un résidu cystéine. Il joue un rôle très important dans les mécanismes de maintien de l'équilibre redox des cellules et leur détoxification, en tant que première ligne de défense vis-à-vis des toxiques électrophiles. Il s'agit du plus abondant nucléophile mou présent au sein des cellules, à très hautes concentrations. Il peut donc se conjuguer avec des accepteurs de Michael, et cela de façon réversible (Johansson, 2012 ; Schwöbel *et al.*, 2010). Cette conjugaison entraîne une déplétion cellulaire en glutathion libre qui peut être dangereuse pour la cellule, puisqu'il la protège. Une déplétion en glutathion n'est donc généralement pas recherchée en thérapeutique et même évitée. Cependant, moduler la concentration cellulaire de glutathion libre en le liant de façon réversible avec des substances électrophiles peut constituer, dans certains cas, une voie thérapeutique intéressante. Cela permettrait de lutter contre les mécanismes cellulaires de protection et de résistances des cellules cancéreuses envers les traitements et donc d'augmenter leur efficacité (Johansson, 2012 ; Abdalla, 2011).

Un autre système redox cible très intéressant en thérapeutique antiparasitaire est celui de la trypanothione qui présente la particularité de se retrouver exclusivement au sein des espèces de l'ordre des Trypanosomatidés. Au sein de cet ordre se retrouvent les parasites Trypanosomes et Leishmanies, agents responsables de parasitoses humaines et animales que sont les Trypanosomiasés et les Leishmaniosés. Ce système remplace le système de défense au stress oxydant du glutathion présent chez les mammifères et est vital pour la survie des parasites (**Figure 14**). L'inhibition spécifique du métabolisme redox dépendant de la trypanothione apparaît actuellement comme un nouveau challenge dans la conception de nouvelles molécules thérapeutiques (Flohé, 2012). Certaines molécules naturelles trypanocides présentant un motif accepteur de Michael semblent être capables d'inhiber ce système, en formant des adduits avec des fonctions sulfhydryles de la trypanothione réduite

T(SH)<sub>2</sub> ou en inhibant directement la réductase (**Figure 14**) (Zimmermann *et al.*, 2013 ; Hamilton *et al.*, 2006).



**Figure 14** : Le système redox trypanothione.

La Trypanothione Réductase (TryR) réduit la trypanothione disulfide T(S)<sub>2</sub> en dihydrotrypanothione T(SH)<sub>2</sub> (Patterson *et al.*, 2011). Les accepteurs de Michael sont capables d'inhiber ce système indispensable à la survie des parasites de la famille des Trypanosomatidés.

#### I. 4.5. Voies de signalisation

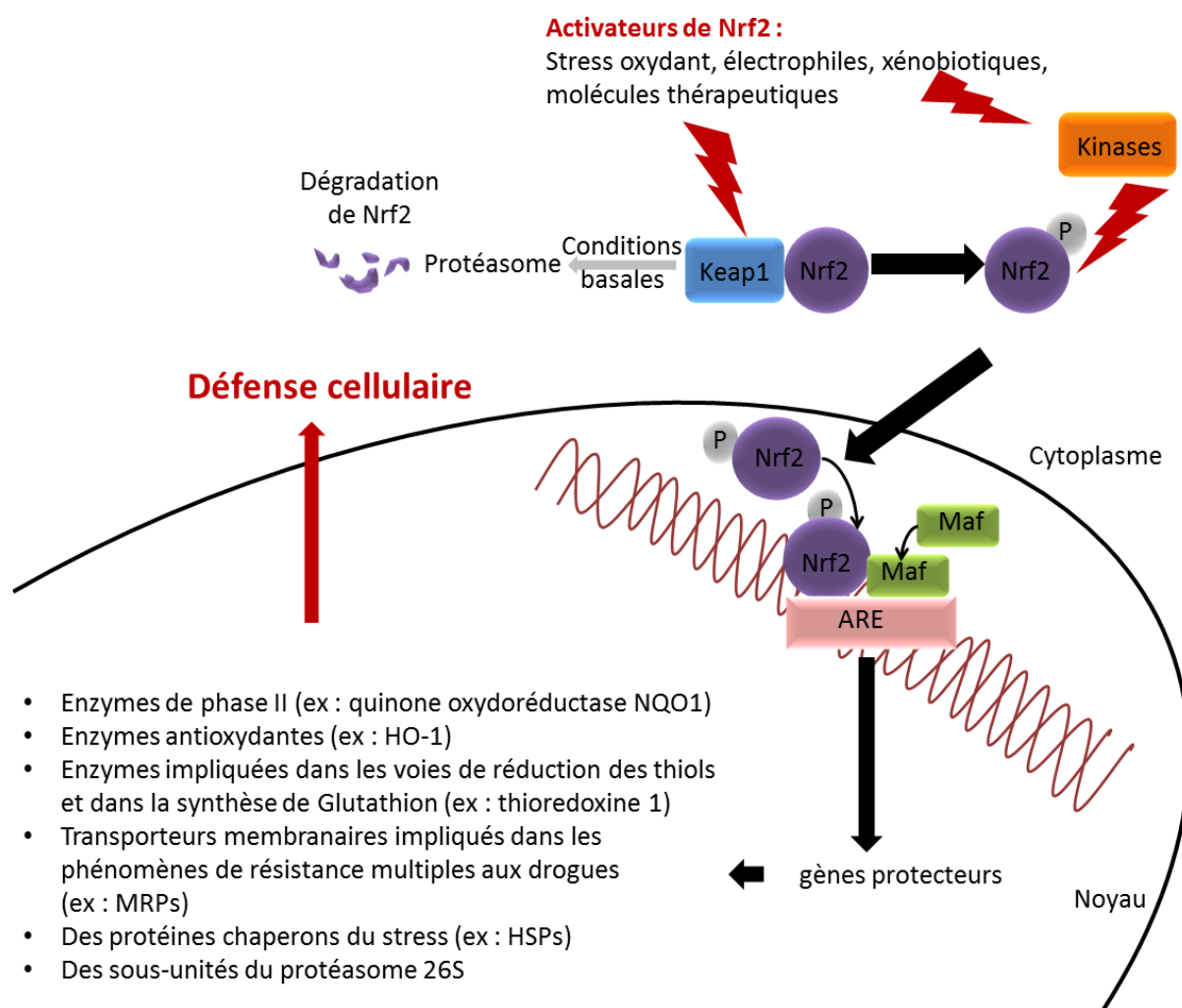
Deux voies biologiques importantes ont été identifiées comme les cibles privilégiées des accepteurs de Michael et plus particulièrement du motif carbonyle  $\alpha,\beta$ -insaturé. Ce sont les voies de signalisation impliquant les facteurs nucléaires NF- $\kappa$ B et Keap1-Nrf2-ARE (Johansson, 2012 ; Amslinger, 2010).

NF- $\kappa$ B est une famille de facteurs de transcription nucléaires régulant les réponses immunitaire et inflammatoire, et protégeant les cellules de l'apoptose. Ils jouent un rôle clé dans la réponse inflammatoire en induisant la transcription de gènes pro-inflammatoires en réponse à un stress ou un pathogène (Tak et Firestein, 2001 ; Aggarwal et Gehlot, 2009). Une suractivation de NF- $\kappa$ B peut néanmoins conduire à un certain nombre de pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, des maladies inflammatoires intestinales, la sclérose multiple et l'asthme (Tak et Firestein, 2001). Ces facteurs de transcription jouent également un rôle crucial dans la cancérogenèse et en font une cible importante en cancérologie (Aggarwal et Gehlot, 2009). Les accepteurs de Michael, et particulièrement les

systèmes carbonylés  $\alpha,\beta$ -insaturé, sont d'excellents inhibiteurs de ces protéines régulatrices, agissant par alkylation de résidus cystéines critiques pour le maintien de l'activité protéique, principalement au niveau de la sous-unité p65 (Rüngeler *et al.*, 1999 ; García-Piñeres *et al.*, 2001).

La voie Keap1-Nrf2-ARE, quant à elle, est une voie de défense et de survie cellulaire adaptative très importante. Le facteur de transcription Nrf2 (Nuclear factor Erythroïde 2-Related Factor 2) joue un rôle essentiel dans la régulation du stress oxydant et la détoxification cellulaire d'espèces électrophiles délétères, notamment de xénobiotiques. Il intervient également dans la protection de la cellule au cours de l'inflammation (Maes *et al.*, 2012). Nrf2 contrôle l'expression de très nombreux gènes cytoprotecteurs régulés par des séquences de type ARE (Antioxidant Response Element) (Motohashi et Yamamoto, 2004). En conditions basales, le facteur de transcription Nrf2 est séquestré par la protéine cytosolique Keap1 (Kelch-like erythroid cell-derived protein with CNC homology [ECH]-associated protein) qui réprime ses fonctions protectrices notamment en induisant sa dégradation par le protéasome (Luo *et al.*, 2007 ; Hybertson et Gao, 2014). Lorsque la cellule est soumise à une agression, Nrf2 se détache de Keap1 et se transloque au niveau du noyau. À ce niveau, il se lie à une séquence ARE, entraînant l'expression des gènes cibles protecteurs codant pour de nombreuses enzymes et autres protéines permettant la défense cellulaire, notamment vis-à-vis des espèces réactives de l'oxygène. Nrf2 peut également être modulé par des phosphorylations post-transcriptionnelles exercées par des kinases (voir I.4.2 et **Figure 15**).





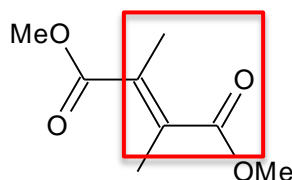
**Figure 15 :** Voie de signalisation Keap1-Nrf2-ARE.

En cas d'agression de la cellule ou sous l'influence d'activateurs de Nrf2 (ex: molécules chimiques), le facteur de transcription Nrf2 initialement lié à la protéine Keap1 est stabilisé et se dissocie. Il se transloque ensuite au niveau du noyau où il se lie à une séquence de type ARE, induisant la transcription de gènes protecteurs et la synthèse d'enzymes et protéines impliquées dans la défense cellulaire. Nrf2 peut également être modulé par l'action de kinases (Fourquet, 2008 ; Hybertson et Gao, 2014 ; Kumar *et al.*, 2014).

Le stress oxydant joue un rôle critique dans l'installation de nombreuses maladies, notamment le cancer, les maladies inflammatoires chroniques (Reuter *et al.*, 2010), certaines maladies neurodégénératives (Thanan *et al.*, 2014 ; Radi *et al.*, 2014), cardiovasculaires (Elahi *et al.*, 2014), maladies chroniques (Urano *et al.*, 2013), gastro-intestinales (Bhattacharyya *et al.*, 2014), respiratoires (Sussan et Biswal, 2014) et les maladies infectieuses, notamment parasitaires (Deramaudt *et al.*, 2013). Dans un certain nombre de cas, une déplétion en Nrf2 est directement impliquée ou bien contribue à l'installation de ces maladies. Dans d'autres cas plus spécifiques, un niveau cellulaire élevé de facteur de transcription Nrf2 peut s'avérer au contraire délétère. C'est le cas par exemple au niveau des

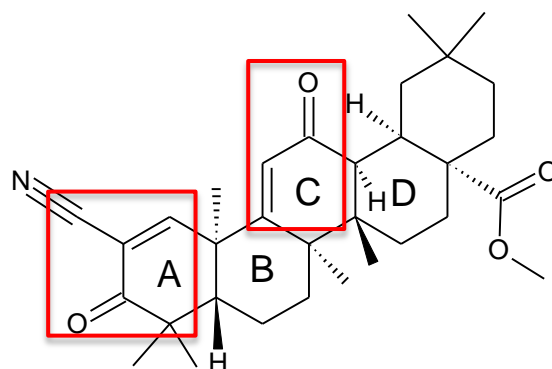
cellules cancéreuses où une corrélation a été établie entre de forts taux de Nrf2, la surexpression de molécules régulées par celui-ci (glutathion, HO) et le développement de mécanismes de survie de la cellule cancéreuse : résistance aux traitements, promotion de l'angiogénèse, métastases, résistance au stress oxydant et à l'apoptose de ces cellules déprogrammées (Reuter *et al.*, 2010). Le développement d'inducteurs ou, dans ce dernier cas, d'inhibiteurs de Nrf2 constitue une stratégie thérapeutique nouvelle très prometteuse (Hybertson *et al.*, 2011; Hybertson et Gao, 2014 ; Deramaudt *et al.*, 2013).

Le **diméthyl fumarate (BG-12)** est un ester d'acide carboxylique  $\alpha,\beta$ -insaturé (**Figure 16**) qui active la voie de signalisation Nrf2 à faible concentration. La molécule est actuellement commercialisée sous le nom de Tecfidera® (Biogen Idec®) pour le traitement de la sclérose multiple (source : « HAS : Tecdifera », 2014). L'association **diméthyl fumarate** et monoéthyl fumarate ([**DMeF-MEF**]) est disponible sous l'appellation Fumaderm® (Biogen Idec®) en Allemagne pour le traitement du psoriasis (Sheremata *et al.*, 2014). Il est très probable que le mécanisme d'action du **DMeF**, encore non résolu, soit lié à une addition de type Michael sur la cystéine 151 de Keap1 (Schmidt *et al.*, 2007 ; Ghoreschi *et al.*, 2011; Takaya *et al.*, 2012).



**Figure 16** : Structure du diméthyl fumarate, activateur de la voie Nrf2

Le **méthyl de Bardoxolone (RTA 402 ou CDDO-Me)** est un triterpénoïde synthétique présentant des groupements  $\alpha,\beta$ -insaturés au niveau des cycles A et C (**Figure 17**). Il s'agit d'une molécule prometteuse dans la prévention et le traitement de cancers solides avancés et lymphomes (Hong *et al.*, 2012) et en tant qu'agent anti-inflammatoire. Les groupements  $\alpha,\beta$ -insaturés sont des positions-clés dans le maintien des propriétés anti-inflammatoires du **CDDO-Me**. Ce dernier agit à deux niveaux, par activation de la voie Keap1/Nrf2 et inhibition de NF- $\kappa$ B. Le mécanisme d'action le plus probable est une addition de Michael avec des résidus cystéines de Keap1 et IKK $\beta$  (Inhibitor of  $\kappa$ B Kinase). Le **méthyl de Bardoxolone** a été évalué en essais cliniques de phase 3 chez des patients atteints de maladies rénales chroniques et de diabète de type 2 (Wang *et al.*, 2014). Ces essais ont d'abord été stoppés suite à des effets secondaires au niveau cardiovasculaire, mais ont repris en 2014 (source : « Clinical Trials : RTA 402 » ; 2015). Le **méthyl de Bardoxolone** est également évalué à différents stades d'essais cliniques pour certains cancers et en traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire (Wang *et al.*, 2014 ; source : « Clinical Trials : bardoxolone », 2015).



**Figure 17** : Structure du méthyl de Bardoxolone activateur de la voie Keap1/Nrf2 et inhibiteur de la voie NF-κB

Certains accepteurs de Michael ont été identifiés comme ligands ou activateurs potentiels de PPAR $\gamma$  (Le Lamer *et al.*, 2014 ; Festa *et al.*, 2012). Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs nucléaires PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor). PPAR $\gamma$  joue un rôle essentiel dans le métabolisme lipidique, la sensibilisation des tissus périphériques à l'insuline, l'inflammation et la prolifération cellulaire (Dubuquoy, 2006 ; Rosen et Spiegelman, 2001). Ce récepteur nucléaire est également exprimé au sein des monocytes et des macrophages où il participe à la promotion de la différenciation des macrophages et induit la transcription de récepteurs de surface importants pour le système immunitaire inné (récepteur scavenger CD36, Macrophage Mannose Receptor (MMR)) (Coste *et al.*, 2003 ; Berry *et al.*, 2007). Ainsi, les ligands de PPAR $\gamma$  pourraient être des agents thérapeutiques intéressants dans le traitement de nombreuses maladies, telles que les cancers, les maladies inflammatoires (Murphy et Holder, 2000 ; Dubuquoy, 2006), mais aussi le paludisme (Serghides *et al.*, 2014).

## **I. 5. Potentiel thérapeutique des accepteurs de Michael dans les infections parasitaires**

### **I. 5.1. Inhibition des systèmes enzymatiques et REDOX des parasites**

L'une des premières stratégies pour lutter contre les maladies infectieuses, incluant les parasitoses, est d'empêcher la survie et la croissance du pathogène au sein de l'hôte. L'agent thérapeutique doit être le plus sélectif possible afin d'éviter l'apparition d'effets secondaires. Plusieurs systèmes enzymatiques et redox indispensables à la survie des parasites ont été précédemment identifiés comme étant des cibles intéressantes des AM (chapitre I.4) : certaines protéases à cystéine (voir I.4.1) et kinases (voir I.4.2) présentes chez les protozoaires et le système redox Trypanothione présent uniquement chez les Trypanosomatidés (voir I.4.4.). L'inhibition de ces cibles biologiques constitue une voie

thérapeutique non seulement prometteuse, mais également une alternative par rapport aux traitements antiparasitaires actuels.

## I. 5.2. Modulation de l'immunité de l'hôte

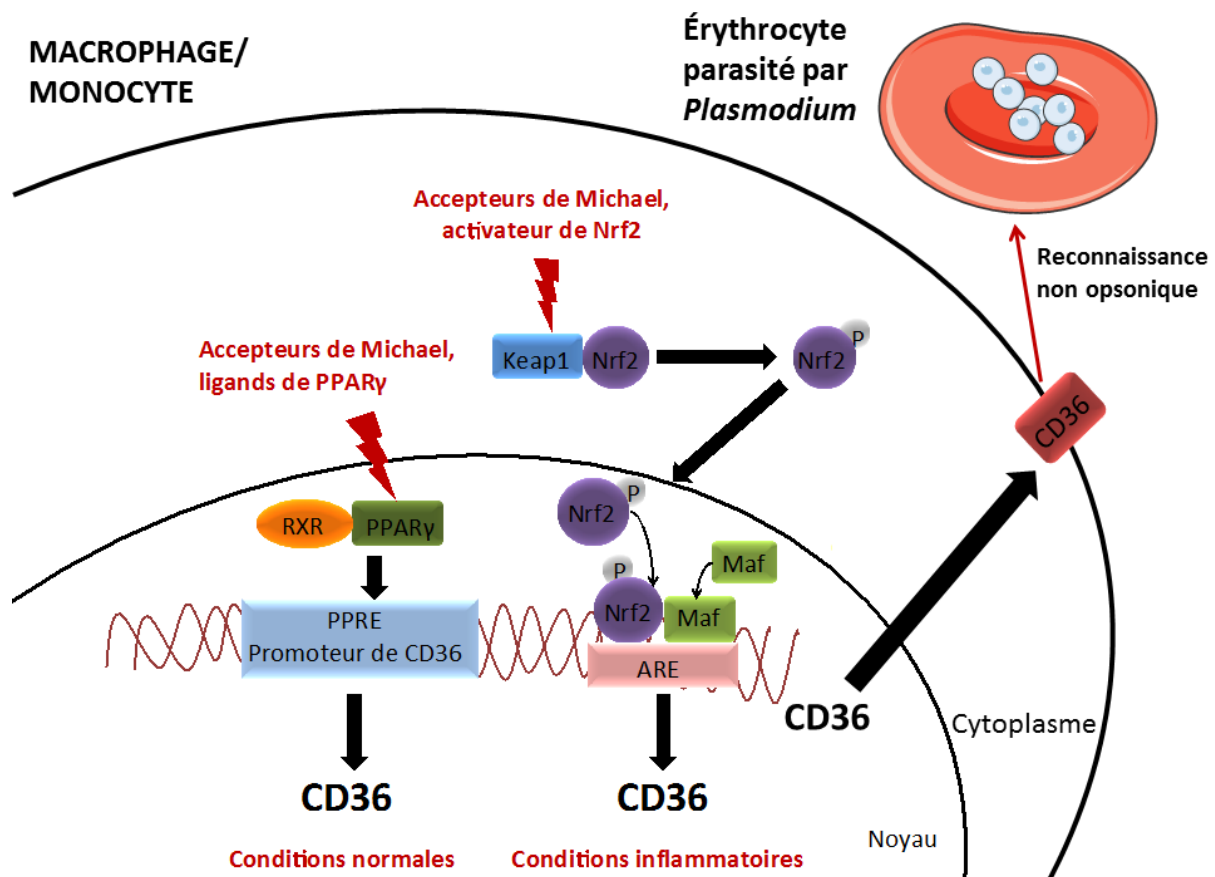
### I. 5.2.1 Induction du récepteur scavenger CD36

Dans le cas d'un paludisme avéré, l'une des stratégies thérapeutiques consiste à lutter contre l'infection en augmentant la clairance sanguine du parasite et en diminuant le risque de développement d'un neuropaludisme (NP).

Les cellules mononucléaires représentent la première ligne de défense de l'immunité innée contre les agents infectieux. Cette immunité passe par la reconnaissance de motifs moléculaires caractéristiques du non soi et des pathogènes, appelés PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns), grâce à une famille de récepteurs cellulaires capables de distinguer le soi du non soi, nommés PRRs (Pattern Recognition Receptors). Cette reconnaissance permet de déclencher des mécanismes de protections que sont la phagocytose opsonique (marquage avec un anti-corps de reconnaissance) ou non, l'activation du complément et l'activation de la réaction inflammatoire.

L'un de ces PRRs, le récepteur scavenger CD36, exprimé à la surface des monocytes/macrophages, est impliqué dans la réponse aux pathogènes tels que les *Plasmodia* puisqu'il est capable de détecter une protéine parasitaire exprimée par les érythrocytes parasités puis de phagocyter ces mêmes érythrocytes de façon non opsonique (Galès, 2009). La phagocytose non opsonique, en tant que réponse immunitaire innée non spécifique, est donc précoce et indispensable à la clairance du parasite.

L'expression de CD36 est sous contrôle du récepteur PPAR $\gamma$  en conditions normales (Berry *et al.*, 2007). Cependant, en conditions inflammatoires, comme dans le cas d'une infection palustre, PPAR $\gamma$  n'est plus capable de promouvoir l'expression de CD36 et une autre voie, la voie Nrf2, prend le relais (Olagnier *et al.*, 2011). Par ailleurs, PPAR $\gamma$  et Nrf2 seraient capables de renforcer leur expression, réciproquement (Ikeda *et al.*, 2000 ; Cho *et al.*, 2010). Il a été démontré au cours de précédentes études (Serghides et Kain, 2001 ; Olagnier *et al.*, 2011) que les ligands de PPAR $\gamma$  et des activateurs de Nrf2 induisaient une augmentation de la phagocytose des érythrocytes parasités *via* la surexpression de CD36 (**Figure 18**). Par ailleurs, les agonistes de PPAR $\gamma$  semblent posséder des propriétés neuroprotectives dans le cas d'un NP (Serghides *et al.*, 2014).



**Figure 18 :** Voies de régulation du récepteur scavenger CD36 dans le macrophage/monocyte.

En conditions normales, la voie PPAR $\gamma$  contrôle l'expression de CD36. En conditions inflammatoires, la voie Nrf2 prend le relais. Les accepteurs de Michael en tant qu'activateurs de ces deux voies peuvent augmenter la transcription de CD36 et favoriser la phagocytose macrophagique non opsonique précoce des érythrocytes parasités par *Plasmodium*.

### I. 5.2.2 Induction de l'hème hoxygénase HO-1

Le facteur de transcription Nrf2 contrôle également l'expression de nombreuses enzymes, dont celle de l'hème oxygénase 1 (HO-1). Cette enzyme cytoprotectrice métabolise l'hème en fer, biliverdine et monoxyde de carbone (Tenhunen *et al.*, 1968). Ce sont ces catabolites qui sont responsables des propriétés physiologiques protectrices, notamment anti-oxydante, anti-inflammatoire et anti-apoptotique ainsi que du maintien d'une bonne microcirculation sanguine indispensable à la perfusion et l'oxygénation des tissus et des organes (Lyouni *et al.*, 2007). Ces raisons font que depuis plusieurs années, l'hème oxygénase 1 est devenue une cible thérapeutique potentielle dans le cas de maladies inflammatoires (Ryter et Choi, 2015), vasculaires et cardiovasculaires notamment (Durante, 2010 ; Wu *et al.*, 2011).

HO-1 joue également un rôle important dans l'immunité. En effet, cette enzyme module les fonctions effectrices des phagocytes mononucléaires, particulièrement des

macrophages et des cellules dendritiques (Hull *et al.*, 2014). Le rôle de HO-1 au sein de ces cellules est complexe et passe par divers mécanismes de régulation, décrits en détail par Hull et collègues (2014). Cela inclut la production de cytokines, l'expression de récepteurs de surface, la modulation de l'état de maturation et de polarisation de ces cellules en un phénotype pro- ou bien anti-inflammatoire. L'induction de HO-1 favorise la différenciation de macrophages anti-inflammatoires (Hull *et al.*, 2014).

Au cours d'une infection palustre, le parasite provoque lors de sa phase intra-érythrocytaire une importante hémolyse des globules rouges conduisant à une libération d'hémoglobine qui va rapidement s'oxyder et générer de l'hème libre. Cette hème, proinflammatoire, cytotoxique et vasoactive, va promouvoir le risque de développement d'un NP chez l'hôte, un syndrome neurovasculaire souvent d'issue fatale (Jeney *et al.*, 2014). Il a été démontré, *in vivo*, chez modèle murin, que l'induction de l'HO-1 en réponse à une infection à *Plasmodium*, supprimait non seulement la survenue de NP (Pamplona *et al.*, 2007) mais réduisait également la pathogénicité du paludisme sévère non-cérébral chez la souris (Seixas *et al.*, 2009). Cette action cytoprotectrice ne passe pas par une diminution de la charge parasitaire de l'hôte mais limite la sévérité de la maladie (Jeney *et al.*, 2014). L'induction de l'HO-1 *via* la stimulation de l'expression de Nrf2 constitue donc une approche thérapeutique intéressante pour lutter contre le paludisme et plus particulièrement pour diminuer les risques de survenue d'un NP chez les patients infectés.

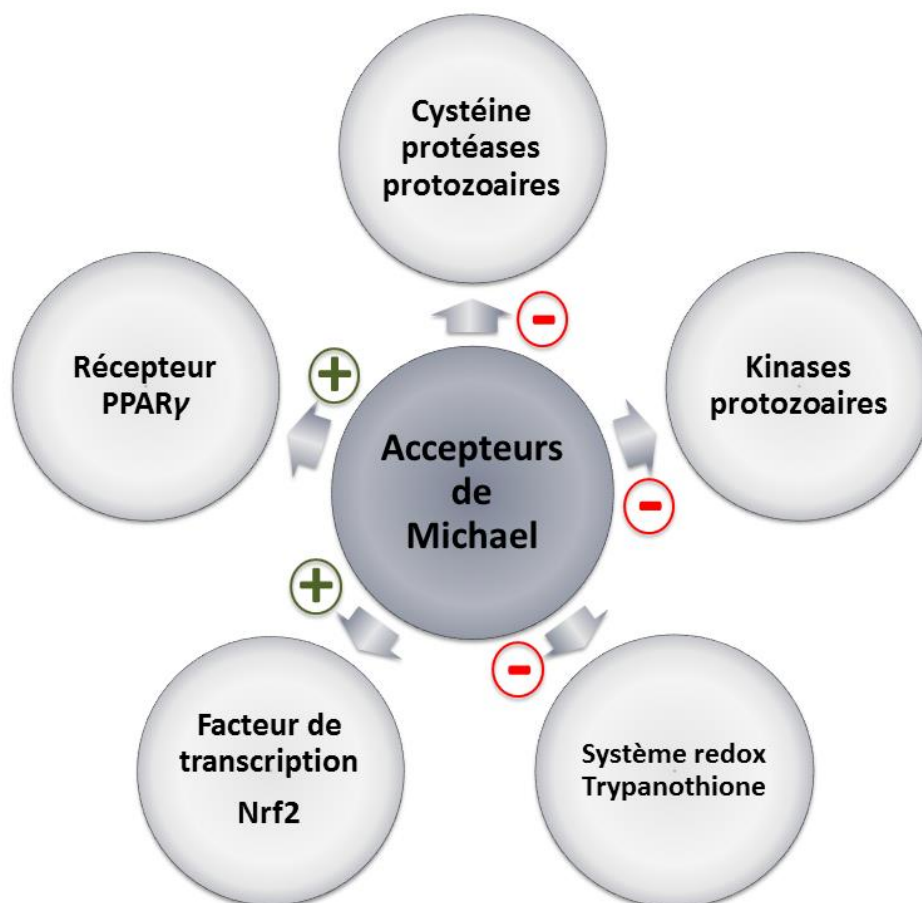
Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'induction de cette même enzyme pourrait avoir des effets intéressants dans le cas d'autres infections parasitaires. L'équipe de Paiva a publié en 2012 des résultats intéressants dans le cas d'infections à *Trypanosoma cruzi*. L'étude a montré que l'activation de la voie Nrf2/HO-1 chez des souris infectées par le parasite, réduisait la parasitémie sanguine et macrophagique ainsi que le parasitisme tissulaire. Inversement, un inhibiteur de l'HO-1 augmentait les taux sanguins de parasites (Paiva *et al.*, 2012). Le mécanisme d'action exact reste encore à élucider.

La modulation des facteurs de transcriptions PPAR $\gamma$  et Nrf2 constitue donc une stratégie thérapeutique intéressante et innovante. Les accepteurs de Michael en tant qu'activateurs de ces deux voies pourraient constituer des agents antiparasitaires prometteurs.

## I. 6. Conclusion partielle

Jusqu'à très récemment, les composés électrophiles, dont les accepteurs de Michael, étaient souvent délaissés et même dénigrés dans la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques. Cela était principalement dû à l'absence de sélectivité de leur mécanisme d'action et au caractère souvent irréversible des liaisons établies avec les nucléophiles biologiques (Krishnan *et al.*, 2014 ; Johansson, 2012). Les accepteurs de Michael sont souvent associés à un risque de forte toxicité, incluant des risques d'immunogénicité, de carcinogénicité et de dermatites de contact (Mulliner *et al.*, 2011 ; LoPachin *et al.*, 2012). Récemment, la découverte du mode d'action *via* addition de Michael de principes actifs depuis longtemps sur le marché et le développement de nouvelles molécules prometteuses,

dont certaines sélectives (**Neratinib**, **K777**), ont suscité un regain d'intérêt pour cette classe de composés. Les accepteurs de Michael possèdent un fort potentiel thérapeutique notamment dans le traitement de maladies parasitaires. Cela peut passer par une inhibition directe des mécanismes de survie du parasite ou bien par modulation de l'immunité de l'hôte permettant d'augmenter ses mécanismes de défense vis-à-vis du pathogène (**Figure 19**).



**Figure 19** : Cibles biologiques potentielles des systèmes accepteurs de Michael pour la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques antiparasitaires

La formation d'adduits avec les groupements sulfhydryles des macromolécules est apparue comme un mécanisme important dont la maîtrise constitue un challenge pour le développement de futurs traitements. De nouvelles études permettant d'approfondir les relations structures/activités ainsi que le rôle joué par différents facteurs (réversibilité, pH, compétition de nucléophiles) dans la réactivité des AM et leur toxicité ont vu le jour (Amslinger, 2010 ; Johansson, 2012). En attendant de mieux comprendre ces relations, le bioguidage constitue une voie de découverte essentielle pour l'identification de nouvelles molécules. Cela permet aussi d'alimenter les bases de données structurales de cette classe thérapeutique importante et à terme, peut-être, de mieux comprendre leur mécanisme d'action et d'identifier de nouvelles cibles biologiques.

Le monde végétal a toujours été et continue d'être une source considérable d'approvisionnement et d'inspiration dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Les plantes synthétisent, pour leur survie et leur protection, un certain nombre de métabolites secondaires présentant au sein de leurs structures des systèmes accepteurs de Michael : les aldéhydes-, amides-, cétones-,  $\gamma$ -lactones-,  $\delta$ -lactones- ou nitrones-  $\alpha,\beta$ -insaturés et vinylsufone leur conférant des activités biologiques intéressantes (Gersch *et al.*, 2012). Parmi les grandes familles de métabolites secondaires présentant des systèmes accepteurs de Michael, peuvent être cités les composés phénoliques tels que les cinnamates, coumarines, chalcones, curcuminoïdes (Dinkova-Kostova *et al.*, 2001), les N-alkylamides ou bien encore les plus connues, les lactones sesquiterpéniques. Cette dernière classe de métabolites comprend de nombreuses molécules bioactives et est particulièrement représentée au sein de la famille végétale des Asteraceae.

## II. Données botaniques de la plante étudiée

### II. 1. Les Asteraceae

#### II. 1.1. Position systématique

La famille des Asteraceae, aussi appelée Compositae, est la plus vaste famille de plantes à fleurs, suivie des Orchidaceae. Il s'agit d'une famille cosmopolite. Elle est principalement distribuée en région tempérée, subtropicale, ou tropicale, souvent en région montagneuse (Cronquist, 2001 ; Singh, 2004). Parmi les plantes vasculaires, il s'agit de la famille la plus diversifiée. Elle comprend en effet entre 1 600 et 1 700 genres et 24 000 à 30 000 espèces (Funk *et al.*, 2005). Si on considère le nombre total estimé d'espèces végétales dans le monde, d'environ 298 000 espèces (Mora *et al.*, 2011), la famille des Asteraceae regrouperait donc à elle seule entre 8% à 10% des espèces.

Depuis que l'Homme s'intéresse à la systématique, plusieurs systèmes de classification du monde végétal ont été proposés. Depuis Théophraste (370-285 av. J.-C) qui a tenté d'établir une classification rudimentaire en quatre groupes principaux, jusqu'à notre époque, de nombreux auteurs ont proposé différents principes de classification (Piroux, 2002). Ces derniers ont fait appel à des approches très distinctes. Au sein d'un même courant, des critères de classification variables ont été établis, ne permettant pas toujours d'établir de consensus, ni même de corrélations entre les différentes familles, ordres et sous-classes proposés par les différents systèmes. Afin de faciliter la compréhension, deux classifications seulement seront détaillées ici. Il s'agit des classifications les plus récentes et actuellement les plus usitées.

La première d'entre elles, très largement diffusée, fût proposée par le botaniste Arthur Cronquist (1919-1992) qui a publié dans les années 1980 plusieurs ouvrages de référence et



directement inspirée de celle proposée par Linné au XVIII<sup>ème</sup> siècle (Piroux, 2002). Il présente un système de « classification classique » des Dicotylédones basé sur des critères morphologiques et anatomiques. À la fin du XX<sup>e</sup> siècle, un nouveau système de classification, apparu avec les nouvelles avancées de la science en matière de séquençage de l'ADN, est basé sur les caractères génétiques des végétaux. Cette nouvelle classification dite « moléculaire » s'appuie sur les travaux d'un groupe de recherche nommé « Angiosperm Phylogeny Group », abrégé par APG. Une première classification a été publiée en 1998, « APG I », puis fût révisée à deux reprises : « APG II » (2003) et dernièrement « APG III » (2009).

Selon la classification établie par Cronquist, les Asteraceae sont des dicotylédones, et cette famille est l'unique représentante de l'ordre des Asterales (**Tableau 1**).

**Tableau 1 :** Position taxonomique de la famille des Asteraceae selon Cronquist (1988)

Classification selon Cronquist (1988)	
Règne	Plantae
Sous-Règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermaphytes
Sous-Embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones)
Sous-classe	Asterideae
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae

Dans la classification APG (**Tableau 2**), l'ordre des Asterales contient 11 familles, dont la famille des Asteraceae (source : « The Angiosperm Phylogeny Group », 2009). La classification n'a pas subi de grands changements depuis la première classification APG I en 1998 (source : « The Angiosperm Phylogeny Group », 1998), si ce n'est des remaniements de familles.

**Tableau 2 :** Position taxonomique de la famille des Asteraceae selon APG III (2009)

Classification selon APG III	
Clade	Angiospermes
Clade	Eudicotylédones
Clade	Eudicotylédones supérieures
Clade	Asteridae
Clade	Campanulidae = Euasteridae II
Ordre	Astérales
Famille	Asteraceae

La famille des Asteraceae est divisée en sous-familles, elles-mêmes divisées en tribus, bien que leurs nombres, noms et compositions varient selon les auteurs et dans le temps. Ainsi, Bremer en 1994, reconnaissait 3 sous-familles Asteroideae, Barnadesioideae et Cichorioideae, divisées en 17 tribus (Bremer, 1994). Depuis, la famille des Asteraceae a fait l'objet de constants remaniements quant à ses divisions, notamment grâce aux récents travaux de biologie moléculaire et au nombre croissant de nouveaux échantillons. Finalement, selon Funk (2009) et l'APweb, il existe actuellement 12 sous-familles au sein de la famille des Asteraceae (**Tableau 3**), incluant elles-mêmes 43 tribus (Funk *et al.*, 2009 ; Reveal, 2012; source : « Angiosperm Phylogeny » 2014).

**Tableau 3 :** Les douze sous-familles de la famille des Asteraceae d'après APweb (source : « Angiosperm Phylogeny Website », 2014)

- |                                    |                                   |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| ➤ Barnadesioideae Bremer & Jansen  | ➤ Carduoideae Sweet               |
| ➤ Mutisioideae Lindley             | ➤ Pertyoideae Panero & Funk       |
| ➤ Stifftioideae Panero             | ➤ Gymnarrhenioideae Panero & Funk |
| ➤ Wunderlichioideae Panero & Funk  | ➤ Cichorioideae Chevallier        |
| ➤ Gochnatioideae Panero & Funk     | ➤ Corymbioideae Panero & Funk     |
| ➤ Hecastocleidoideae Panero & Funk | ➤ Asteroideae Lindley             |

## II. 1.2. Caractères généraux morphologiques des Asteraceae

Ce sont généralement des plantes herbacées érigées ou grimpantes, annuelles, bisannuelles ou pérennes, parfois des arbustes et plus rarement des arbres. Certaines peuvent développer un tubercule (ex : *Dahlia*). Les feuilles des Asteraceae sont habituellement alternes, mais peuvent être aussi opposées, parfois en rosettes basales (ou terminales chez les arbustes monocaules) ou même verticillées. Les feuilles non stipulées sont en général simples, entières ou découpées, parfois composées. Les inflorescences, caractéristiques, consistent en un capitule plan, convexe ou concave, entouré d'un involucre de bractées. On note la présence ou non de bractées stériles sur le réceptacle capitulaire, entre les fleurs. En fonction du type de fleur composant le capitule, il existe différentes sortes d'inflorescences : tubuleuses composées uniquement de fleurs actinomorphes ; ligulées composées uniquement de fleurs zygomorphes ligulées à cinq dents ; labiatiflores composées uniquement de fleurs zygomorphes bilabiées et, enfin, radiées, composées de fleurs zygomorphes ligulées à trois dents à la périphérie et de fleurs actinomorphes tubulées au centre.

Les fleurs sont sessiles. La formule florale des Asteraceae est  $5S/5P/5E/2C$ . La fleur est cyclique, hétérochlamyde, gamopétale, actinomorphe ou zygomorphe, isostémone, épigyne, bisexuée, unisexuée ou même stérile. Le calice est absent ou réduit et se développe après fécondation en pappus soyeux, plumeux ou écailleux. La corolle est soit régulière et pentalobée, soit zygomorphe et bilabée, soit encore unilatéralement développée en une longue ligule, tri- ou pentadentée. Les étamines, au nombre de 5, sont insérées sur la corolle, les filets sont libres et les anthères sont soudées pour former un tube autour du style (synanthie). Elles sont à déhiscence longitudinale. On note la présence d'un disque

nectarifère épigyne. Le gynécée est formé de deux carpelles soudés et d'un ovaire, infère, pseudomonomère uniloculaire. On note la présence de deux stigmates et d'un seul ovule anatrophe, unitégumenté.

Le fruit des Asteraceae, le cypsèle, est un akène typique formé à partir de l'ovaire infère. Il est surmonté généralement du pappus persistant (plus rarement décidu). La graine, exalbuminée, a un embryon droit (Cronquist, 2001 ; Spichiger, 2002 ; Singh, 2004).

## II. 1.3. Intérêt des Asteraceae

### II. 1.3.1 Intérêt économique des Asteraceae

Certaines espèces d'Asteraceae sont des plantes ornementales, comme les asters, les dahlias, les chrysanthèmes, les gerberas, les zinnias et les genres *Helichrysum* et *Tagetes* (Singh, 2004). De nombreuses espèces d'Asteraceae sont également à la base de l'alimentation. *Helianthus annuus*, le tournesol, cultivé pour ses graines oléagineuses est certainement le meilleur exemple de l'importance économique de cette famille. Actuellement, la production de tournesol est en quatrième position mondiale en termes de production de graines oléagineuses, après le soja, le colza et le coton. D'après un rapport de la Division Statistique de l'Organisation des Nations Unies « Food and Agriculture Organization » (FAOSTAT), elle a été évaluée entre 2012 et 2013 à 37 449 403 tonnes, cultivées sur près de 24 843 104 Ha. (sources : « FAOSTAT », 2014; « FAO: sunflower » 2014 ; « USDA : Table 13: Sunflowerseed and Products World Supply and Distribution », 2014 ; « USDA : Table 18: World: Sunflower and Products Supply and Distribution », 2014).

Une autre espèce oléagineuse appartenant à la famille des Asteraceae, le carthame des teinturiers ou safran des teinturiers, *Carthamus tinctorius* L., est également cultivée pour ses graines dont est extraite l'huile à usage alimentaire, mais également les graines utilisées notamment pour l'alimentation des oiseaux. Le carthame des teinturiers était auparavant une plante tinctoriale du textile dont on extrayait des colorants rouge et jaune, notamment la carthamine, principal constituant du pigment rouge. *C. tinctorius* L. est utilisé dans l'alimentation en tant qu'épice et colorant alimentaire, mais également en cosmétique (Li *et al.*, 1996 ; Zehra, 2005).

Les espèces d'Asteraceae ont aussi une place à tenir dans la recherche de nouvelles énergies renouvelables puisque les huiles de tournesol et de carthame ont été identifiées comme huiles végétales prometteuses dans la fabrication de biocarburants (Demirbaş et Kara, 2006 ; Sensöz et Angin, 2008). Ces huiles sont transformées en biofuel notamment grâce à différents procédés de trans-estérification des triglycérides (Ma et Hanna, 1999). L'amélioration de ces procédés de transformation reste un enjeu pour l'obtention d'un biocarburant de qualité (Antolin *et al.*, 2002 ; Calero *et al.*, 2014 ; Yin *et al.*, 2012).

D'autres espèces d'Asteraceae entrent également dans l'alimentation courante comme les laitues (genre *Lactuca*), l'artichaut (*Cynara*), la chicorée (*Cichorium*).

Les espèces *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch.Bip. ou pyrèthre de Dalmatie, et *Tanacetum coccineum* (Willd.) Grierson ou pyrèthre rose, présentent un intérêt économique puisque de la plante sont isolées plusieurs molécules, les pyréthrine, utilisées comme insecticides. Ces pyréthrine naturelles ont inspiré par la suite la structure d'analogues synthétiques, les pyréthrineoïdes (Casida et Quistad, 1995). Ces molécules sont notamment utilisées dans la lutte antivectorielle du paludisme. La production mondiale de pyrèthre en 2012 a été évaluée à 5 862 tonnes de drogues sèches par l'organisation FAOSTAT ; principalement produites en République de Tanzanie et en Papouasie-Nouvelle-Guinée. (source : « FAOSTAT », 2014).

## II. 1.3.2 Intérêt thérapeutique des Asteraceae

La famille des Asteraceae fournit des espèces très importantes d'un point de vue thérapeutique, ce qui n'est pas surprenant étant donné le nombre de genres qu'elle contient. De nombreuses espèces sont utilisées en médecine traditionnelle et sont associées à un panel d'activités thérapeutiques aussi large que la diversité de cette famille.

Dans de nombreux cas, l'effet thérapeutique de ces plantes médicinales a été corrélé à la présence de métabolites secondaires de types lactones sesquiterpéniques, caractéristiques de cette famille. L'un des cas les plus connus certainement est celui de l'artémisinine, lactone sesquiterpénique aux propriétés antipaludiques, isolée de *Artemisia annua*, longtemps utilisée en médecine traditionnelle chinoise pour cet usage (Graziose *et al.*, 2010). D'autres exemples peuvent être cités. Il a été démontré notamment que deux espèces d'arnica, *Arnica montana* et *Arnica chamissonis* ssp. *foliosa*, utilisées traditionnellement dans le traitement des contusions, hématomes, rhumatismes et inflammation de la peau, synthétisaient l'hélénaline, la 11 $\alpha$ ,13-dihydrohélénaline et le chamissonolide, lactones sesquiterpéniques pour lesquelles des propriétés anti-inflammatoires ont été mises en évidence, validant leur usage traditionnel (Lyss, 1998). Actuellement, 43 espèces d'Asteraceae sont inscrites dans la liste des plantes médicinales de la Pharmacopée française (11<sup>e</sup> Édition); dont 37 sur la liste A et 6 sur la liste B (sources : « liste A des Plantes médicinales utilisées traditionnellement inscrites à la Pharmacopée française », 2014 ; « liste B des Plantes médicinales utilisées traditionnellement en l'état ou sous forme de préparation dont les effets indésirables potentiels sont supérieurs au bénéfice thérapeutique attendu inscrites à la Pharmacopée française », 2014).

Les propriétés biologiques attribuées aux Asteraceae sont très nombreuses, notamment des propriétés antitumorale, cytotoxique, immunosuppressive, antioxydante, anti-acétylcholinestérase, antimicrobienne, antivirale, antifongique, leishmanicide, trypanocide, antipaludique, hépatoprotective, cytotoxique, larvicide, antiulcéreuse, antiinflammatoire, antinociceptive, antitussive, expectorante, antidiabétique et hémolytique. Cette liste est loin d'être exhaustive (Zheng *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2014 ; Hussain *et al.*, 2013 ; Arora *et al.*, 2013 ; Abad *et al.*, 2012).

Les espèces d'Asteraceae sont également connues pour provoquer des allergies, notamment des dermatites de contact, allant de l'eczéma à l'éruption vésiculaire. Ces allergies peuvent se

manifester par contact direct avec la plante ou bien par disséminations de certaines parties sèches de la plante, des poils sécréteurs, ou même du pollen, mais aussi au contact de cosmétiques ou produits formulés à partir d'extraits de plante (Picman, 1986 ; Paulsen *et al.*, 2008 ; Jack *et al.*, 2013). Il a été démontré que ces allergies étaient dues principalement, mais pas seulement, à la présence là encore de terpénoïdes de type lactones sesquiterpéniques (Paulsen *et al.*, 2008), agissant comme des haptènes ou des antigènes partiels (Merfort, 2011). L'utilisation de préparations traditionnelles, cosmétiques ou autres à partir d'espèces de cette famille n'est donc pas anodine et doit se faire avec précaution chez les sujets susceptibles de faire une réaction allergique.

## II. 2. Le genre *Pseudelephantopus* J.B. Rohr

### II. 2.1. Position systématique

Le genre *Pseudelephantopus* J.B. Rohr a été décrit pour la première fois en 1792 par Julius Philip Benjamin von Rohr dans *Skifter af Naturhistorie-Selskabet* (Skr. Naturhist.-Selsk. 2(1): 213–214. 1792), initialement nommé et écrit *Pseudo-elephantopus* Rohr.

De nos jours l'appellation *Pseudelephantopus* avec la disparition du trait d'union, mais aussi de la lettre « o » s'est largement répandue. Or le Code International de Nomenclature des algues, champignons et plantes ou « Code Melbourne » (source : « CIN, XVIII<sup>e</sup> Congrès International de Botanique, Melbourne », 2011) précise dans l'article 20.3 de la section 3 du chapitre III que « le nom d'un genre ne peut être composé de deux mots, excepté s'ils sont connectés par un trait d'union ». De plus il est précisé en note 3 de l'article 60.9, section 1, chapitre IX, « qu'un nom de genre publié avec un trait d'union ne peut être modifié que par conservation » contrairement aux épithètes composées qui bénéficient de l'article 60.9, et pour lesquelles les traits d'union doivent être supprimés (sauf certaines conditions précisées dans ce même article). Le nom de genre « *Pseudo-elephantopus* » est cité dans cette même note (exemple n°27) précisant qu'il est devenu *Pseudelephantopus* Rohr (1792) par conservation, sur une proposition de Nicolson en 1981 (Nicolson, 1981). Cette modification rend le nom de genre *Pseudo-elephantopus* Rohr obsolète et désormais rejeté (source : « International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants », 2014).

Le statut de *Pseudelephantopus* en tant que genre ou bien sous-genre d'*Elephantopus* a également été discuté. Le nom dérive en effet du nom de genre *Elephantopus*, en raison de ressemblances entre leurs espèces (Porter, 1971). Certains auteurs, notamment D.L. Nash et L.O. Williams, J.A. Clonts et S. McDaniels, ont donc inclus *Pseudelephantopus* Rohr comme sous-genre d'*Elephantopus* (Nash et Williams, 1976 ; Clonts et McDaniels, 1978 ; Herbst, 1999). Selon d'autres auteurs, les espèces du genre *Pseudelephantopus* diffèrent d'*Elephantopus* par l'aspect de nombreux caractères, notamment l'aspect du pappus qui présente chez *Pseudelephantopus* des soies paléacées ou des écailles dont au moins certains poils sont pliés ou frisés, un akène possédant des glandes, mais dépourvu d'idioblastes, ainsi que par l'aspect du capitule et la présence de bractées foliacées non spécialisées (Porter, 1971 ; Isawumi, 1999 ; Herbst, 1999). Sur la base de ces différences morphologiques, ils ont

attribué les espèces du genre *Pseudelephantopus* à un genre bien distinct, en s'appuyant également sur le nombre de chromosomes différents. Le genre *Pseudelephantopus* présente un nombre de chromosomes  $n=13$  (Jeffrey, 1988) alors qu'il est de  $n=11$  pour les espèces du genre *Elephantopus*.

Finalement, le Code International de la Nomenclature Botanique adopté en 1994 (Code de Tokyo) a réglé cette question. *Pseudelephantopus* y est bien conservé en tant que genre (voir référence N° 8775a de l'ICBN de Tokyo, 1996) (source : « International Code of Botanical Nomenclature (Tokyo Code) - Appendix IIIA E. Spermatophyta [5] », 2014). Il sera donc considéré ainsi dans ce travail.

Le genre *Pseudelephantopus* appartient à la très large tribu des Vernonieae incluse dans la sous-famille des Cichorioideae, et à la sous-tribu des Elephantopodinae (**Tableau 4**) et ne comporte que deux espèces : *Pseudelephantopus spicatus* (Juss. ex Aubl.) C.F. Baker et *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist (source : « Global Compositae Checklist », 2014).

**Tableau 4 :** Classification du genre *Pseudelephantopus* (The Angiosperm Phylogeny Group, 2009 ; Robinson et Smithsonian Institution, 1999)

Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Sous-famille	Cichorioideae
Tribu	Vernonieae
Sous-tribu	Elephantopodinae
Genre	<i>Pseudelephantopus</i>
Espèces	<i>P. spicatus</i> (Juss. ex Aubl.) C.F. Baker <i>P. spiralis</i> (Less.) Cronquist

## II. 2.2. Caractères généraux morphologiques du genre *Pseudelephantopus* J.B. Rohr

Le genre *Pseudelephantopus* J.B. Rohr est caractérisé par des plantes herbacées, pérennes, stolonifères ou non, à tige dressée, solitaire et peu ramifiée, poilue à subglabre.

Le feuillage présente des poils raides simples. Les feuilles sont principalement caulinaires, alternes, sessiles ou pétiolées (pétioles plus ou moins ailés, fréquemment embrassants) et à nervation pennée. Les feuilles se réduisent peu à peu en bractées semblables à celles de l'inflorescence, oblanceolées à obovales, sinuées ou subentières à légèrement dentées, glabrescentes à poilues, communément glanduleuses sur la face inférieure.

Les inflorescences minces, terminales et latérales sont des épis ou des grappes d'épis. Les capitules sont groupés en glomérules, formés de 1 à 5 capitules, généralement à l'aiselle d'une à 2 bractées. Les capitules sont formés de 4 fleurs. L'involucre est ramassé et

cylindrique. Les bractées de l'involucre sont au nombre de 8, en 4 paires décussées, apprimées, lancéolées, carénées, souvent glanduleuses et parfois duveteuses au niveau distal.

Le fleuron est bisexué ; la corolle est zygomorphe, l'ensemble des lobes rayonnant vers l'extérieur à partir de l'involucre. La corolle est de couleur blanche à violette, en forme d'entonnoir, profondément et inégalement lobée en 5 lobes, plus profondément découpée entre les deux lobes latéraux-ventraux. Les tubes sont plus longs que les lobes, très légèrement éperonnés au niveau basal.

Les anthères sont sagittées. Le pollen présente 3 pores à exine et est légèrement échinolophate - c'est-à-dire formé d'une sorte de réseau de crêtes entourant des zones de dépressions ou lacunes-. Le style est filiforme et velu.

L'akène est ovoïde légèrement aplati, présentant 8 à 10 côtes, duveteux et glanduleux entre les nervures. Chaque akène est surmonté d'un pappus persistant, formé de 6 à 10 soies semblables ou le plus souvent inégales. Seules les soies latérales, ou bien l'ensemble des soies, sont plissées ou torsadées à la pointe, et sont généralement plus longues que l'akène (Pruski, 2011 ; Kadereit et Jeffrey, 2007 ; Isawumi, 1999).

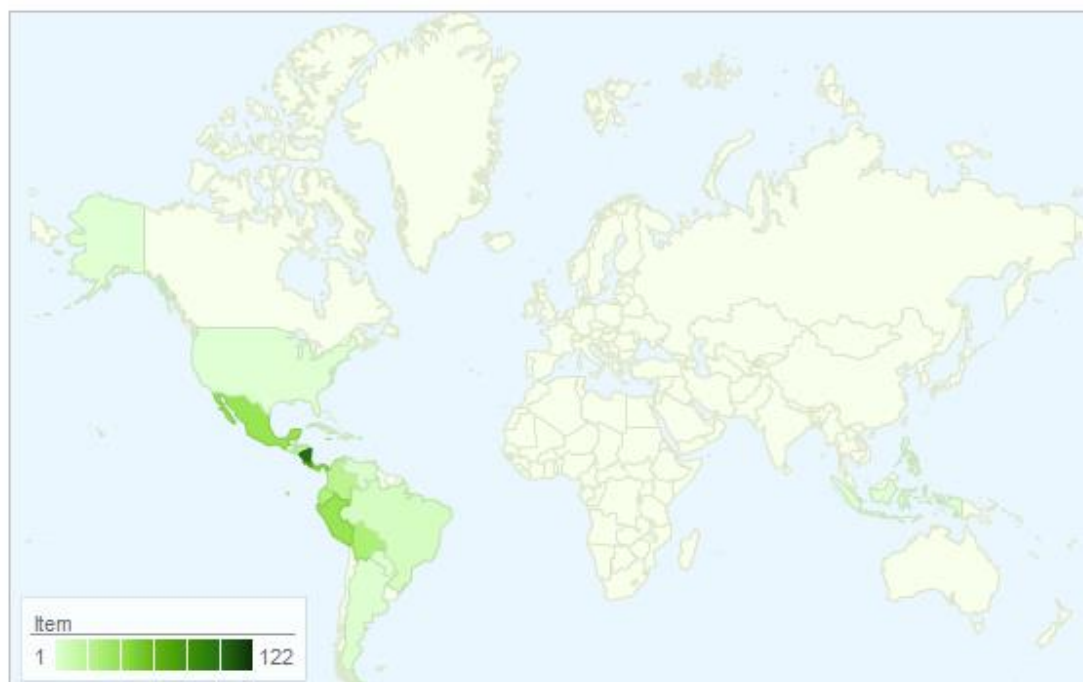
Le genre *Pseudelephantopus* J.B. Rohr ne contient que deux espèces très proches, mais bien distinctes : *Pseudelephantopus spicatus* (Juss. ex Aubl.) C.F. Baker et *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist (Pruski, 2011). La distinction des deux espèces se fait principalement par l'allure du pappus et de l'akène.

*P. spiralis* a le même aspect général que *P. spicatus*, mais elle se répand par des stolons, longs et minces. Les parties aériennes et les inflorescences sont souvent plus pubescentes, présentant des poils en général plus nombreux, plus longs et plus facilement détachables. Les inflorescences ont tendance à être plus compactes, présentant en dessous du capitule des bractées foliacées moins proéminentes, et des glomérules plus ramassés. L'involucre, quant à lui, est moins rigide et mesure 7-8 mm de haut.

Les akènes de *P. spiralis* mesurent 3-4 mm de long, ils sont soit nettement glanduleux, soit glabres ou finement hispides au niveau des nervures. Le pappus présente plusieurs soies fines, les plus grandes (ou toutes) sont légèrement spiralées, crépues ou frisées dans la moitié distale, d'où le nom de « spiralis ». Elles mesurent 3-5 mm de long en partant de la base au sommet, et sont toutes beaucoup plus douces que les deux principales barbes du pappus de *P. spicatus* (Porter, 1971).

## II. 2.3. Distribution géographique du genre

La carte fournie en **Figure 20** représente la distribution mondiale du genre *Pseudelephantopus* Rohr, par pays. En Amérique, les espèces du genre sont des espèces natives tropicales (Mabberley, 2008) et leur introduction au Pérou est pantropicale (Macbride, 1936).



**Figure 20 :** Carte de la distribution mondiale de *Pseudelephantopus* Rohr, établie par pays.  
 (© 2014 Missouri Botanical Garden - 4344 Shaw Boulevard - Saint Louis, Missouri 63110  
 Source : “Tropicos, botanical information system at the Missouri Botanical Garden -  
 www.tropicos.org”) (« Tropicos | Name - *Pseudelephantopus* (Less.) Cronquist » 2015).

## II. 3. *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist

### II. 3.1. Nomenclature et statut de l'espèce

L'espèce *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist a été décrite en 1970 par Arthur Cronquist (Cronquist, 1970).

Une récente mise à jour des espèces appartenant à la famille des Asteraceae, coordonnée par l'Alliance Internationale des Compositae (TICA), et l'Institut Smithsonian définit le statut taxonomique de l'espèce *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist comme « statut accepté » (source : « Global Compositae Checklist: “*Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist” », 2014). Cependant, selon cette même source, la nomenclature de l'espèce telle que « *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist » a un statut « illégitime », le nom de l'espèce étant « non résolu » à ce jour. En l'absence de nomenclature acceptée à ce jour, le nom de *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist sera utilisé dans ce manuscrit en référence à l'espèce.

Le basionyme de l'espèce est *Distreptus spiralis* Less. et les synonymes acceptés sont :

*Spirochaeta funckii* Turcz.

*Chaetospora spiralis* (Less.) Aspl. & S.F.Blake

*Chaetospora funckii* (Turcz.) S.F.Blake



*Pseudelephantopus funckii* (Turcz.) Philipson

*Elephantopus spicatus* auct. non Juss.

*Pseudelephantopus funckii* (Turcz.) Cabrera

*Elephantopus spiralis* (Less.) Clonts

*Chaetospira spiralis* (Less.)

## II. 3.2. Description botanique

*Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist est une espèce herbacée pérenne, stolonifère, à tige dressée et ramifiée, de 0,1 à 0,8 (1,2) m de hauteur. Les longs stolons s'enracinent aisément. Les tiges sont striées, velues à hirsutes, occasionnellement fistulosées. Les feuilles sont caulinaires, les pétioles sont indistincts. Les feuilles ont une longueur de 2 à 7(14) cm sur 1,2 à 2(4,5) cm de large. Elles sont oblancéolées à oblongues. Les deux faces sont hispides et la face inférieure est également glanduleuse. La base des feuilles est cunéiforme à atténuée avec des marges sinueuses à faiblement dentelées. L'apex est aigu à largement obtu. L'inflorescence est une grappe présentant jusqu'à 25 épis axillaires, très florifères, homogènes ou plus rarement interrompus. Chaque épi comprend des glomérules formés de 5 à 10 capitules subsessiles, se développant à l'aisselle de bractéoles généralement un peu plus longues que les glomérules. Chaque capitule est entouré des bractées de l'involucre qui sont vertes au niveau apical ou bien de couleur crème avec une membrane hyaline, présentant moins fréquemment des marges violacées. L'apex vert est généralement glanduleux, souvent légèrement cilié sinon glabre présentant un sommet mucroné à faiblement caréné. La corolle est blanche à bleu/pourpre. L'akène, de 2,5 à 3 mm de long, est côtelé et pubescent. Le pappus présente de 3 à 8 soies subégales, filiformes, de 4 à 6 mm de long, unisériées, fortement spiralées à la pointe et dilatées à la base (Macbride, 1936 ; Pruski, 2011) (**Figure 21** et **Figure 22**).



**Figure 21 :** Photos de l'espèce *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist. Echantillon collecté en avril 2011, sur une parcelle cultivée de la réserve nationale protégée Allpahuayo-Mishana, Pérou. À gauche : aspect général de la plante. À droite : inflorescence (Crédit photo : Cynthia Girardi)



**Figure 22 :** *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist  
À gauche : Illustration de Dillon & Turner 1421, F. (Macbride, 1936). À droite : planche d'herbier de *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist, collecté en février 2014 sur une parcelle cultivée de la réserve nationale protégée Allpahuayo-Mishana, Pérou (Crédit photo : Cynthia Girardi)

## II. 3.3. Distribution géographique de l'espèce

*Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist se retrouve largement sur le continent américain, et plus précisément aux Caraïbes, en Mésio-Amérique (Costa Rica, Panama) et Amérique du Sud (Argentine, Bolivie, Brésil, Caraïbes, Colombie, Équateur, Pérou et Vénézuéla) (**Figure 23**).



**Figure 23 :** Carte de la distribution mondiale de *P. spiralis* (Less.) Cronquist établie par pays.  
 (© 2014 Missouri Botanical Garden - 4344 Shaw Boulevard - Saint Louis, Missouri 63110  
 Source : “Tropicos, botanical information system at the Missouri Botanical Garden -  
 www.tropicos.org”) (« Tropicos : MGB Specimen Country Occurrence Map  
*Pseudelephantopus spiralis* » 2015)

Il s'agit d'une herbe commune, souvent invasive, poussant aussi bien sur les pâturages que les terrains vagues (Canizales *et al.*, 2010 ; Ochoa et Andrade, 2003 ; Macbride, 1936). La floraison et la fructification ont lieu tout au long de l'année.

## II. 3.4. Données ethnopharmacologiques et phytochimiques de *Pseudelephantopus spiralis*

### II. 3.4.1 Usages traditionnels de *Pseudelephantopus spiralis*

L'usage de *Pseudelephantopus spiralis* en médecine traditionnelle est recensé dans plusieurs pays d'Amérique Latine.

Au Pérou, la plante, nommée *Mata pasto* ou *Pasto mula* traduit littéralement « tue pâturage » ou « mule des pâturages », est utilisée pour traiter les douleurs menstruelles et comme

dépuratif du foie (source : « Rapport interne : Base de Datos de Las Plantas Medicinales. 2010. IIAP », 2014). Par ailleurs, une enquête ethnopharmacologique a été réalisée en 2011 au sein de la communauté Yanesha de Azulis, au Pérou, par deux chercheurs de notre équipe, Geneviève Bourdy et Valérie Jullian. Cette enquête a révélé que l'espèce *Pseudelephantopus spiralis* faisait partie intégrante de leur pharmacopée traditionnelle. La plante, qu'ils nomment « Lechugia » en espagnol et « Huagshikait » en yanesha, est très utilisée pour soigner la diarrhée de l'enfant et l'adulte, accompagnée de maux d'estomac et associée ou non à de la fièvre. Son usage est également fréquent en cas d'infections de tout type accompagnées de fièvre. La préparation traditionnelle consiste alors en une poignée de plante entière introduite dans un 1 L d'eau, le tout étant ensuite porté à ébullition pendant quelques minutes, puis filtré. L'infusion doit être bue au cours de la journée comme un rafraîchissement et terminée dans la journée. La plante peut aussi avoir une indication préventive chez l'enfant. Elle est alors bouillie et l'infusion est utilisée pour son bain.

Dans le sud de l'Équateur, la plante fraîche entière, *Chicoria*, est cuisinée et consommée pour traiter le paludisme et les symptômes associés tels que la fièvre, les frissons, mais aussi l'hypertension artérielle (Bussmann et Sharon, 2006).

Enfin en Colombie, les racines de la plante sont bouillies longuement et l'infusion est consommée en tant que boisson pour le traitement du paludisme et l'inflammation de la rate et du foie. En cas de paludisme, la plante entière peut être également bouillie en association avec d'autres plantes et l'eau est ensuite administrée en bains dans le but de faire tomber la fièvre et diminuer l'inflammation. La plante est également utilisée dans le cas de fractures et de gastrites (Blair, 2005).

## II. 3.4.2 Propriétés biologiques de *Pseudelephantopus spiralis*

*Pseudelephantopus spiralis* n'a jamais fait l'objet d'études phytochimiques proprement dites, publiées sous ce nom ou l'un des synonymes acceptés pour l'espèce (voir liste des synonymes au II.3.1).

Il existe néanmoins trois rapports publiés sur l'activité biologique d'extraits de la plante. Les extraits chloroformique, méthanolique et aqueux des racines ainsi que des parties aériennes de la plante ont été testés pour leurs potentiels antifongique et molluscicide. Seul l'extrait chloroformique des racines a présenté une faible activité antifongique, évaluée à 100 µg et 50 µg d'extrait, respectivement sur le champignon phytopathogène *Cladosporium cucumerinum* et *Candida albicans* responsable de candidoses chez l'humain (Rahalison *et al.*, 1993). Aucun de ces extraits n'a présenté d'activité molluscicide contre l'espèce *Biomphalaria glabrata*, l'un des hôtes intermédiaires impliqués dans le cycle de la bilharziose, parasitose chronique tropicale provoquée par des vers du genre *Schistosoma* (Marston *et al.*, 1996). L'extrait hydroalcoolique des feuilles a été testé pour ses propriétés antibactériennes sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli* (Rojas *et al.*, 2012). L'extrait a présenté un effet faible à modéré.

## II. 4. Données phytochimiques

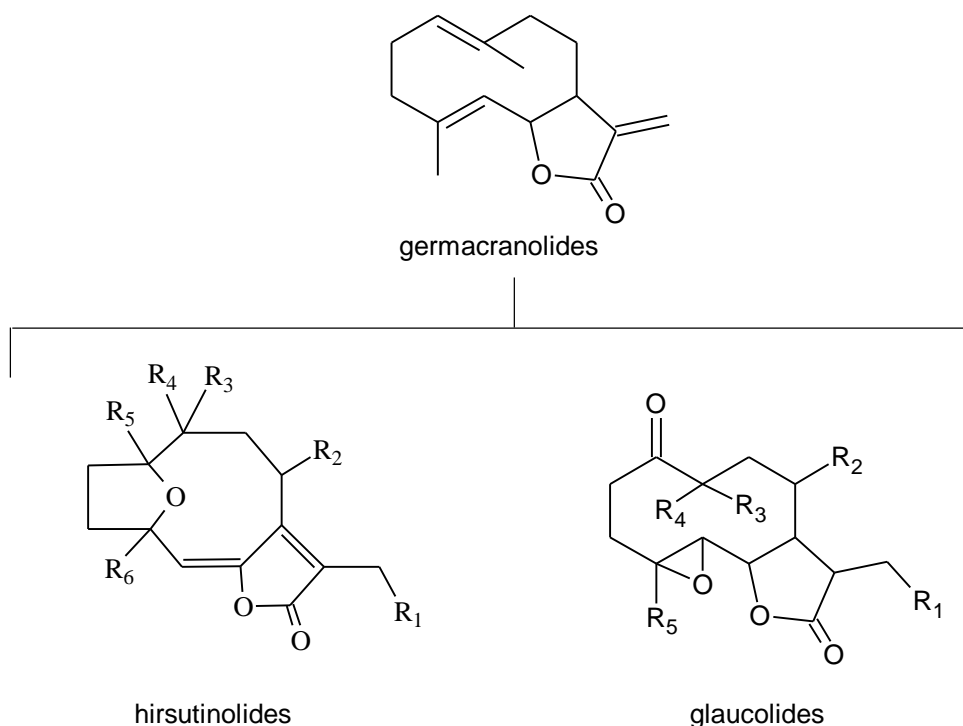
### II. 4.1. Concernant les Asteraceae

L'une des caractéristiques phytochimiques des Asteraceae est leur production importante de terpénoïdes (principalement des lactones sesquiterpéniques), de dérivés oxygénés de sesquiterpènes et diterpènes ainsi que des dérivés polyacétyléniques. Parmi d'autres molécules impliquées dans la défense chimique des espèces d'Asteraceae, on peut citer les flavonoïdes (Bohm et Stuessy, 2001), les coumarines, les dérivés du phénylpropane (Cronquist, 2001 ; Zdero et Bohlmann, 1990 ; Alvarenga *et al.*, 2001) etc. Les Asteraceae ne fournissent aucune espèce synthétisant des iridoïdes (Singh, 2004). La distribution de ces différentes familles chimiques est très variable selon les genres, mais aussi à un niveau taxonomique supérieur selon les tribus. Par exemple, les lactones sesquiterpéniques correspondent à près de 60 % des métabolites secondaires isolés de la tribu des Vernonieae alors qu'ils sont absents de la tribu des Calenduleae, qui contient par contre des diterpènes à plus de 40 %, alors que les Vernonieae n'en contiennent que très peu (Alvarenga *et al.*, 2001). Étant donné cette diversité chimique et l'importance de la famille des Asteraceae, il apparaît plus pertinent de s'intéresser plus précisément à la composition en métabolites secondaires synthétisés par la tribu des Vernonieae, à laquelle le genre *Pseudelephantopus* appartient.

### II. 4.2. Concernant la tribu des Vernonieae

La tribu des Vernonieae tend à une accumulation de lactones sesquiterpéniques hautement oxygénées de type germacranolide (**Figure 24**) et de dérivés polyacétyléniques simples (Zdero et Bohlmann, 1990 ; Bohlmann et Jakupovic, 1990). Au dernier recensement (Zdero et Bohlmann, 1990), parmi les types de germacranolides isolés de cette tribu, 47 % étaient des glaucolides, 19 % des hirsutinolides (structures à la **Figure 24**) et 5 % des dilactones (Zdero et Bohlmann, 1990).

Les lactones sesquiterpéniques de types eudesmanolides, élémanolides et éremophilanolides (structures à la **Figure 26**) sont, quant à elles, très peu représentées chez la tribu Vernonieae. Les composés appartenant à la classe chimique des coumarines sont peu présents, à l'exception de 5-alkyl-coumarines et chromones présentes dans un seul genre de la sous-tribu des Vernoniinae (Zdero et Bohlmann, 1990). De nombreux flavonoïdes ont également été isolés de cette tribu (Bohm et Stuessy, 2001).



**Figure 24** : Les deux grands types de germacranolides isolés de la tribu des Vernonieae : les hirsutinolides et les glaucolides.

#### II. 4.3. Concernant le genre *Pseudelephantopus* J.B. Rohr

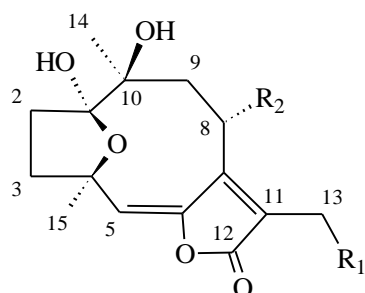
Comme cela a été décrit au chapitre II.2.1, le genre *Pseudelephantopus* ne comprend que deux espèces. *P. spiralis* n'ayant jamais fait l'objet d'études phytochimiques approfondies à ce jour, les seules données phytochimiques du genre concernent celles reportées pour l'espèce *P. spicatus*.

Les molécules isolées à partir de *Pseudelephantopus spicatus* appartiennent à deux larges groupes très proches structuralement, puisque qu'élaborées à partir des mêmes précurseurs : les terpénoïdes majoritairement et les stéroïdes. Les composés sont répertoriés au sein du **Tableau 5** et les structures correspondantes sont présentées dans la **Figure 25**. Au sein du groupe des terpénoïdes, les métabolites secondaires issus de *P. spicatus* correspondent principalement au grand groupe des sesquiterpènes lactones et, pour la majorité d'entre eux, plus particulièrement au sous-groupe des germacranolides (classification des lactones sesquiterpéniques, voir III.2). Ils ont été classés ici en fonction de la position de la fonction hémicétal au sein du cycle à dix chaînons. Trois autres sesquiterpènes lactones de type cadinanolide, les composés **18**, **19**, **20** ont également été isolés, ainsi que les trois terpènes **21**, **22** et **23**. Les germacrane de type glaucolides (ex : composé **15**) sont présents au sein de la sous-tribu des *Elephantopinae* et du genre *Pseudelephantopus* alors qu'ils sont absents de la plupart des sous-tribus des Vernonieae. Ils seraient d'ailleurs les précurseurs des germacrane de types hirsutinolides (composés **1-8**) (voir chapitre III.5.2)

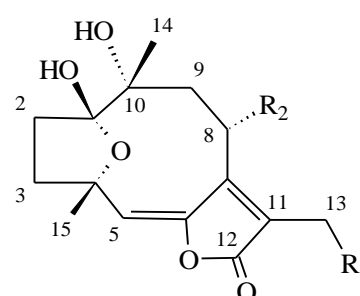
**Tableau 5 :** Molécules isolées de l'espèce *Pseudelephantopus spicatus* d'après la littérature

Type	Nom	Numérotation dans la Fig 25	Références bibliographiques et numérotation des composés dans ces références
Germacranolide fonction hémicétal C4-O- C1-OH	spicatolide D	<b>1</b>	Composé 1 (Yang <i>et al.</i> , 2007)
	spicatolide E	<b>2</b>	Composé 2 (Yang <i>et al.</i> , 2007)
	piptocarphin D	<b>3</b>	Composé 6 (Yang <i>et al.</i> , 2007)
	8R- acétoxy-10R- hydroxy-13- <i>O</i> - méthylhirsutinolide	<b>4</b>	Composé 7 (Yang <i>et al.</i> , 2007)
	8, 13-diacétyl- piptocarphol	<b>5</b>	Composé 1 (Odonne <i>et al.</i> , 2011)
	8-Acétyl-13- <i>O</i> -éthyl- piptocarphol	<b>6</b>	Composé 2 (Odonne <i>et al.</i> , 2011)
	piptocarphol	<b>7</b>	Composé 3 (Issa <i>et al.</i> , 2006)
	isomère en C-8 du piptocarphol	<b>8</b>	Composé 4 (Issa <i>et al.</i> , 2006)
Germacranolide fonction hémicétal C4-O- C1-OH et pont éther C6-O- C10	spicatolide G	<b>9</b>	Composé 4 (Yang <i>et al.</i> , 2007)
Germacranolide pont éther C6-O- C10	spicatolide F	<b>10</b>	Composé 3 (Yang <i>et al.</i> , 2007)
	spicatolide A	<b>11</b>	Composé 8 (Yang <i>et al.</i> , 2007)
			Composé 4a (Ragasa <i>et al.</i> , 1993)
	spicatolide B	<b>12</b>	Composé 4b (Ragasa <i>et al.</i> , 1993)
	spicatolide C	<b>13</b>	Composé 1 (Issa <i>et al.</i> , 2006)
Germacranolide pont éther C7-O- C10	pseudelephantopide 8- <i>O</i> -méthacrylate	<b>14</b>	Composé 13 (Jakupovic <i>et al.</i> , 1985)
Germacranolide	glaucolide B	<b>15</b>	Composé 1 (Ragasa <i>et al.</i> , 1993)
			Composé 6a (Jakupovic <i>et al.</i> , 1985)
Germacranolide	8-désacylmarginatin 8- <i>O</i> -acétate	<b>16</b>	Composé 2a (Jakupovic <i>et al.</i> , 1985)
Deux cycles lactones	spicatolide H	<b>17</b>	Composé 5 (Yang <i>et al.</i> , 2007)
Cadinanolide	13- <i>O</i> - méthylvernojalcanoli de 8- <i>O</i> -acétate	<b>18</b>	Composé 9 (Yang <i>et al.</i> , 2007)
	spicatocadinanolide A	<b>19</b>	Composé 2 (Issa <i>et al.</i> , 2006)
	Cadinanolide	<b>20</b>	Composé 1 (Ragasa et Rideout, 2001)

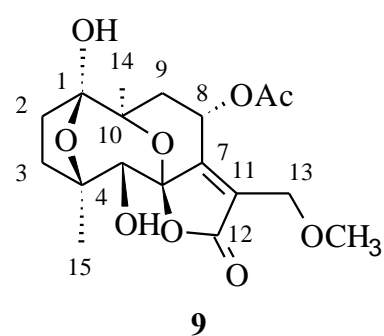
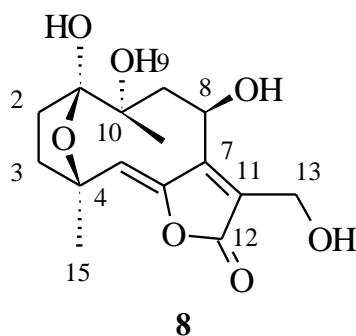
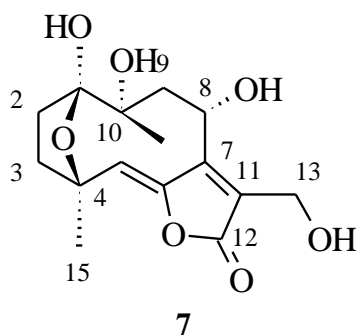
Type	Nom	Numérotation dans la Fig 25	Références bibliographiques et numérotation des composés dans ces références
Sesquiterpène type eudismane	3-Oxo,11,12,13-trihydroxy-eudesm-4-ène	<b>21</b>	Composé 5 (Issa <i>et al.</i> , 2006)
Triterpène	Acide Ursolique	<b>22</b>	Composé 3 (Odonne <i>et al.</i> , 2011)
Phytostérol	Stigmastérol	<b>23</b>	Cité (Ragasa <i>et al.</i> , 1993)



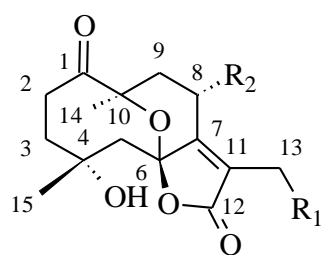
- 1**  $R_1 = \text{OCH}_3$   $R_2 = \text{OH}$   
**2**  $R_1 = \text{OCH}_3$   $R_2 = \text{OCOC}(\text{CH}_3)\text{CHCH}_3$  (forme *E*)  
**3**  $R_1 = \text{OAc}$   $R_2 = \text{OH}$   
**4**  $R_1 = \text{OCH}_3$   $R_2 = \text{OAc}$



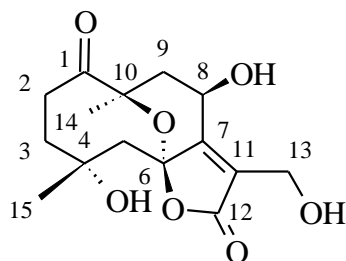
- 5**  $R_1 = \text{OAc}$   $R_2 = \text{OAc}$   
**6**  $R_1 = \text{OEt}$   $R_2 = \text{OAc}$



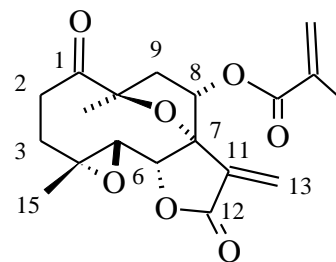




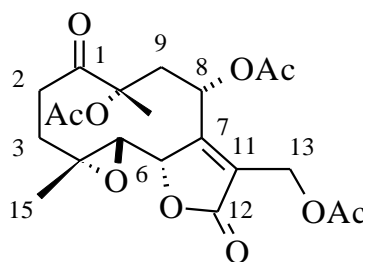
- 10**  $R_1 = \text{OCH}_3$   $R_2 = \text{OH}$   
**11**  $R_1 = \text{OAc}$   $R_2 = \text{OAc}$   
**12**  $R_1 = \text{OEt}$   $R_2 = \text{OAc}$



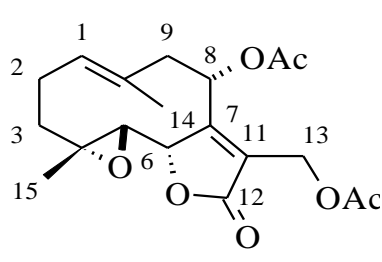
**13**



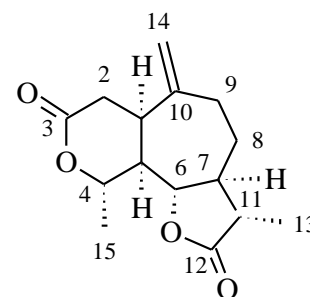
**14**



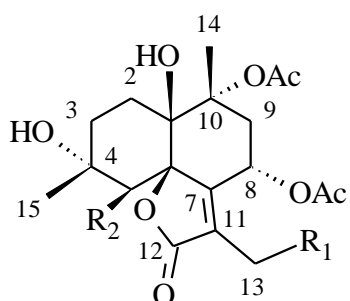
**15**



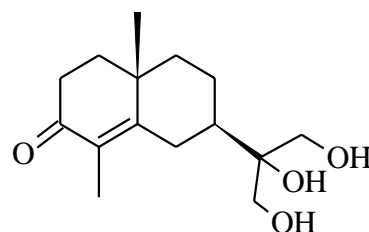
**16**



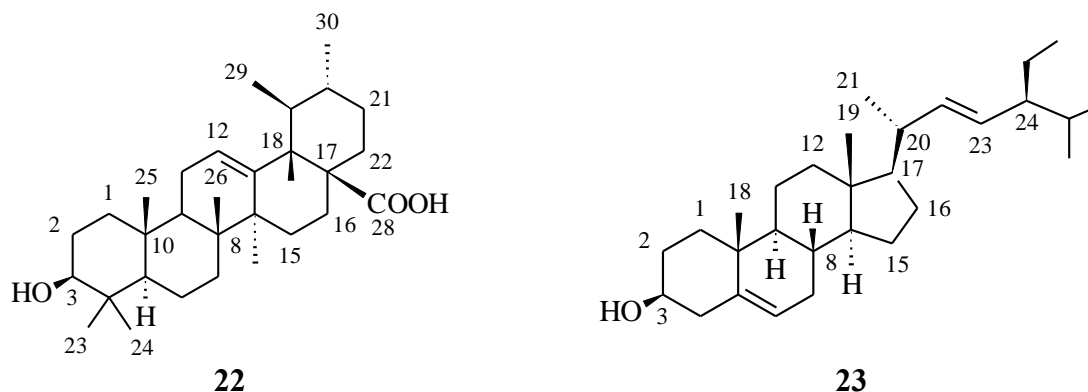
**17**



- 18**  $R_1 = \text{OCH}_3$   $R_2 = \text{OAc}$   
**19**  $R_1 = \text{OCH}_3$   $R_2 = \text{OH}$   
**20**  $R_1 = \text{OEt}$   $R_2 = \text{OAc}$



**21**

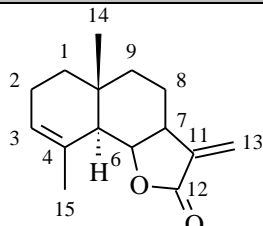
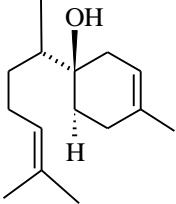
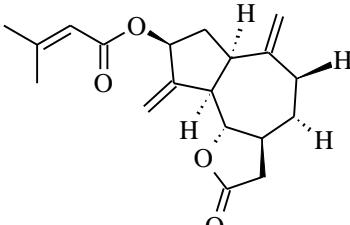


**Figure 25 :** Structures des composés isolés de *P. spicatus* d'après la littérature.

Rq : Les structures ainsi que la stéréochimie des molécules ont été représentées telles qu'elles apparaissent dans les publications citées.

Bohlman et Jakupovic, en 1990, ont réalisé un travail de compilation des molécules isolées de la sous-tribu des Vernoniaeae, incluant *P. spicatus*, d'après la littérature (Bohlmann et Jakupovic, 1990). Au sein de cet article de référencement sont citées cinq molécules, toutes accréditées à un unique article publié par les mêmes auteurs en 1985 (Jakupovic *et al.*, 1985). Or il n'est question dans l'article cité que de l'isolement de trois molécules à partir de *P. spicatus* : les composés **14**, **15** et **16**, présentés dans le **Tableau 5** et la **Figure 25**. Il peut s'agir d'une erreur, mais étant donné qu'il s'agit des mêmes auteurs pour les deux articles, ces composés ont pu être isolés en interne et non publiés. Par souci de rigueur, les composés en question sont donc listés avec leurs structures dans le **Tableau 6**, mais une réserve est cependant émise quant à leur réel isolement à partir de *P. spicatus*. Au sein de ce même article, Bohlman et Jakupovic évoquent également l'isolement du composé **26** à partir de *Pseudelephantopus spiralis*, référencé 30d dans la publication, en précisant bien qu'il s'agit d'un travail qui n'a jamais été publié.

**Tableau 6 :** Composés isolés de *P. spicatus* (A) et *P. spiralis* (B) d'après un travail de compilation d'informations publié par Bohlman et Jakupovic (1990)

	Type	Structure	Numérotation dans la thèse	Références bibliographiques et numérotation des composés dans ces références
A	Germacranolide dérivé du costunolide		24	Composé 50 (Bohlmann et Jakupovic, 1990)
	Sesquiterpénoïde dérivé du bisabolane		25	Composé 89 (Bohlmann et Jakupovic, 1990)
B	Germacranolide guaianolide		26	Composé 30d (Bohlmann et Jakupovic, 1990)

Rq : Les structures ainsi que la stéréochimie des molécules ont été représentées telles qu'elles apparaissent dans les publications citées.

### III. Les lactones sesquiterpéniques

#### III. 1. Généralités

Les lactones sesquiterpéniques sont des métabolites secondaires présentant un noyau sesquiterpénique, c'est-à-dire possédant 15 atomes de carbones, ayant subi par la suite des modifications de structure par cyclisations et oxygénations (Bruneton, 2009).

Elles représentent une classe importante de métabolites secondaires non seulement du point de vue du nombre de composés, mais aussi du fait de leur grande diversité structurale. Une étude publiée en 2006 recensait déjà plus de 5000 structures connues (Schmidt, 2006) présentant des squelettes chimiques très différents. Ce nombre a certainement considérablement augmenté depuis en raison du nombre croissant d'études phytochimiques sur le sujet.

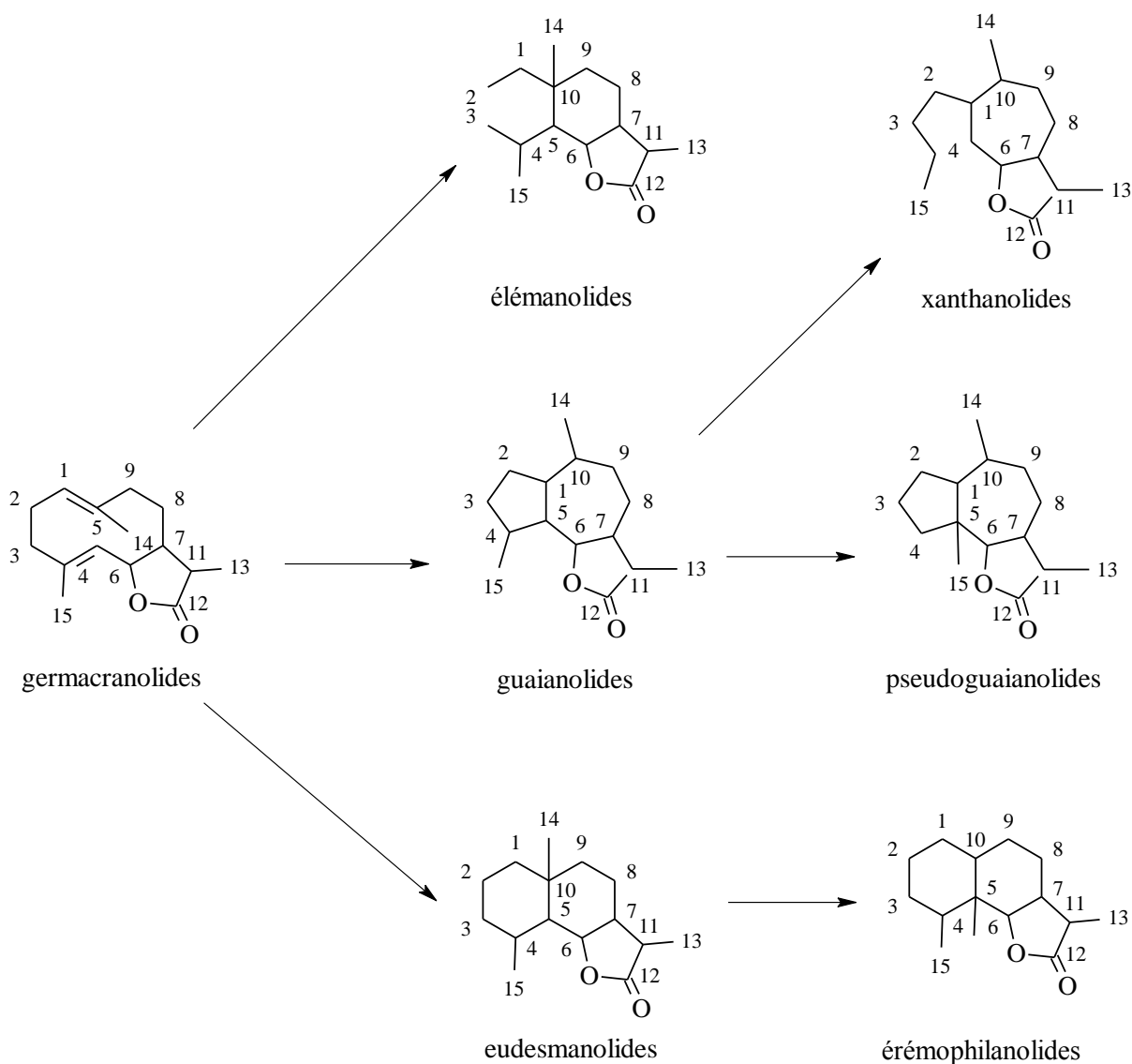
Ces molécules sont présentes chez les champignons, les bryophytes et les plantes. Elles ont notamment été isolées à partir d'espèces végétales de différentes familles telles les Acanthaceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Euphorbiaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Rutaceae, Winteraceae et Hepatideae (Robles *et al.*, 1995). Mais c'est au sein de la famille des Asteraceae qu'elles sont très majoritairement retrouvées. Il a d'ailleurs été démontré que les lactones sesquiterpéniques étaient des marqueurs chimiotaxonomiques pertinents dans la classification de cette famille (Scotti *et al.*, 2012 ; Da Costa *et al.*, 2005 ; Seaman, 1982).

Un autre grand intérêt de l'étude de ces composés vient de leur fort potentiel thérapeutique. De nombreuses plantes contenant des lactones sesquiterpéniques sont fréquemment utilisées en médecine traditionnelle (Duraipandian *et al.*, 2012 ; Odonne *et al.*, 2011 ; Toyang et Verpoorte, 2013) et ces composés ont été largement étudiés depuis de nombreuses années pour leur large spectre d'activités biologiques, telles qu'antibactérienne, antifongique, antiprotozoaire (Picman, 1986) et surtout anti-inflammatoire et antitumorale. Ce sont donc des composés très prometteurs pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques anti-inflammatoires et anticancéreuses (Merfort, 2011 ; Zhang *et al.*, 2005 ; Ghantous *et al.*, 2010). D'un point de vue physico-chimique, il s'agit de composés lipophiles, faiblement volatils, incolores, amers, souvent thermolabiles (Ghantous *et al.*, 2010 ; Merfort 2002).

#### III. 2. Structures

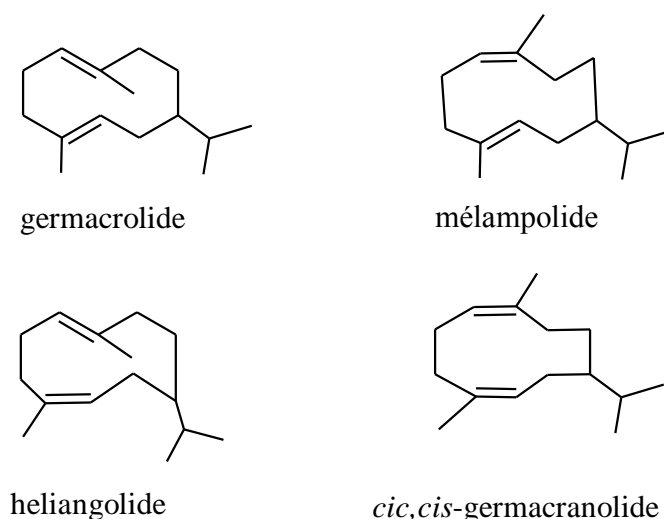
Les lactones sesquiterpéniques sont divisées en groupes structuraux basés sur la structure des squelettes carbonés, auxquels est ajouté le suffixe « olide » indiquant la présence d'une fonction lactone. D'après Schmidt (2006), il existerait 100 groupes de sesquiterpènes différents selon le Dictionnaire des Produits Naturels et plus de 300 selon certains auteurs (Lesburg *et al.*, 1998), mais 87 % des structures de lactones

sesquiterpéniques identifiées dériveraient de sept principaux groupes (Schmidt, 2006). Ces sept groupes majeurs sont le groupe des germacranolides (le plus conséquent), ainsi que 6 groupes dérivant du type précurseur germacranolide : les guaianolides, pseudoguaianolides, eudesmanolides, érémanolides, élémanolides et les xanthanes (**Figure 26**) (Schmidt, 2006).



**Figure 26** : Les sept groupes principaux de lactones sesquiterpéniques d'après Schmidt (2006) et leurs interrelations d'après Fischer *et al.* (1979).

Le groupe des germacranolides est le groupe prédominant en terme de nombre de composés et il est lui-même divisé en sous-groupes selon la configuration des deux doubles liaisons du squelette cyclodécadiène (**Figure 27**) : les germacrolides (*E,E*), hélangiolidés (1(10)-*E,4-Z*), mélampolide (1(10)-*Z,4-E*), *Z,Z*-germacranolides (Fischer *et al.*, 1979). Le sous-groupe des germacrolides est le plus représenté.



**Figure 27** : Les différents sous-groupes des germacranolides établis en fonction de la stéréochimie de leurs doubles liaisons (schéma issu de Fischer *et al.*, 1979)

### III. 3. Biogénèse

Il existe assez peu d'études sur les origines biogénétiques des lactones sesquiterpéniques.

Elles proviennent, au sein des organismes supérieurs, de deux voies de biosynthèse des terpénoïdes : la voie du mévalonate (MVA) située dans le cytosol et la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) situé dans le plastide. Ces deux voies conduisent, soit à partir de l'acétyl-CoA (MVA), soit à partir du pyruvate (MEP), à la formation d'une unité en C5, le pyrophosphate d'isopentényle ou IPP. L'IPP est un intermédiaire clé de la biosynthèse des terpènes. La voie du phosphate de méthylérythritol (MEP) a été découverte plus récemment, au cours des années 80. Il a été démontré que l'IPP à l'origine de la biosynthèse des STLs pouvait provenir de ces deux voies et que des échanges étaient possibles entre les deux compartiments de biosynthèse que sont le cytoplasme et le plastide (van Klink *et al.*, 2003 ; Lopes *et al.*, 2013). L'IPP s'isomérisé ensuite en diméthylallylpyrophosphate (DMAPP) par voie enzymatique. Les deux intermédiaires IPP et DMAPP se condensent par la suite en géranylpyrophosphate (GPP), précurseur du groupe chimique des monoterpènes. Les séries suivantes dérivent de condensations successives : le farnésylIPP (FPP), le géranylgéranylIPP (GGPP), le géranylgéranylIPP (GGPP), géranylfarnésylIPP (GFPP), le squalène et Z-phytoène, qui sont les précurseurs des différentes classes de terpènes (Bruneton, 2009 ; Lamarti *et al.*, 1994).

Le précurseur des sesquiterpènes est le farnésylpyrophosphate (FPP), unité linéaire en C15, et il est généralement admis que les principaux squelettes de lactones sesquiterpéniques dérivent de la cyclisation du conformère *2E, 6E*-farnésylIPP par ionisation du C-2 et départ du pyrophosphate OPP formant le précurseur de l'ensemble des lactones sesquiterpéniques : le

cation germacradiène, un cyclodécadiène (**Figure 28**) (Seaman, 1982 ; Bruneton, 2009). Cet intermédiaire germacrane est ensuite oxydé en fonction carboxylique au niveau du C-12, une double liaison est créée en C-11, constituant l'acide germacranique. Cet acide sera ensuite hydroxylé en position C-6 ou C-8, en  $\alpha$  ou en  $\beta$  du cycle, permettant la formation d'une liaison ester entre l'hydroxyle et le carbonyle conduisant à la lactonisation. L'hydroxyle conduisant à cette lactonisation (que ce soit en position C-6 ou C-8) étant généralement en position *gamma* de la fonction carbonyle, la lactonisation conduit le plus souvent à un cycle à cinq chaînons, c'est-à-dire une  $\gamma$ -lactone (Seaman, 1982 ; De Kraker *et al.*, 2002 ; Ramirez *et al.*, 2013). Les cycles lactones à six chaînons,  $\delta$ -lactones sont beaucoup plus rares (Seaman, 1982). De nombreuses modifications telles que des cyclisations, ruptures de cycle, migration des fonctions méthyles interviennent alors et cela même avant l'étape de lactonisation, conduisant à un large panel de structures, responsables de la diversité structurale de cette classe de molécules. Le schéma représentant la voie de biosynthèse des principaux groupes de lactones sesquiterpéniques est présenté dans la **Figure 28**.

La synthèse des lactones sesquiterpéniques au sein des plantes a lieu principalement au niveau des feuilles, des bractées, des inflorescences, ainsi qu'au niveau des akènes. Ces composés sont séquestrés au sein d'organes spécialisés tels que des poils sécreteurs et peuvent être présents dans un exsudat recouvrant la surface des organes cités précédemment (Seaman, 1982 ; Chadwick *et al.*, 2013). Cette localisation principale au niveau des parties aériennes s'explique par la fonction principale de ces métabolites secondaires qui est la protection chimique de la plante envers ses prédateurs.

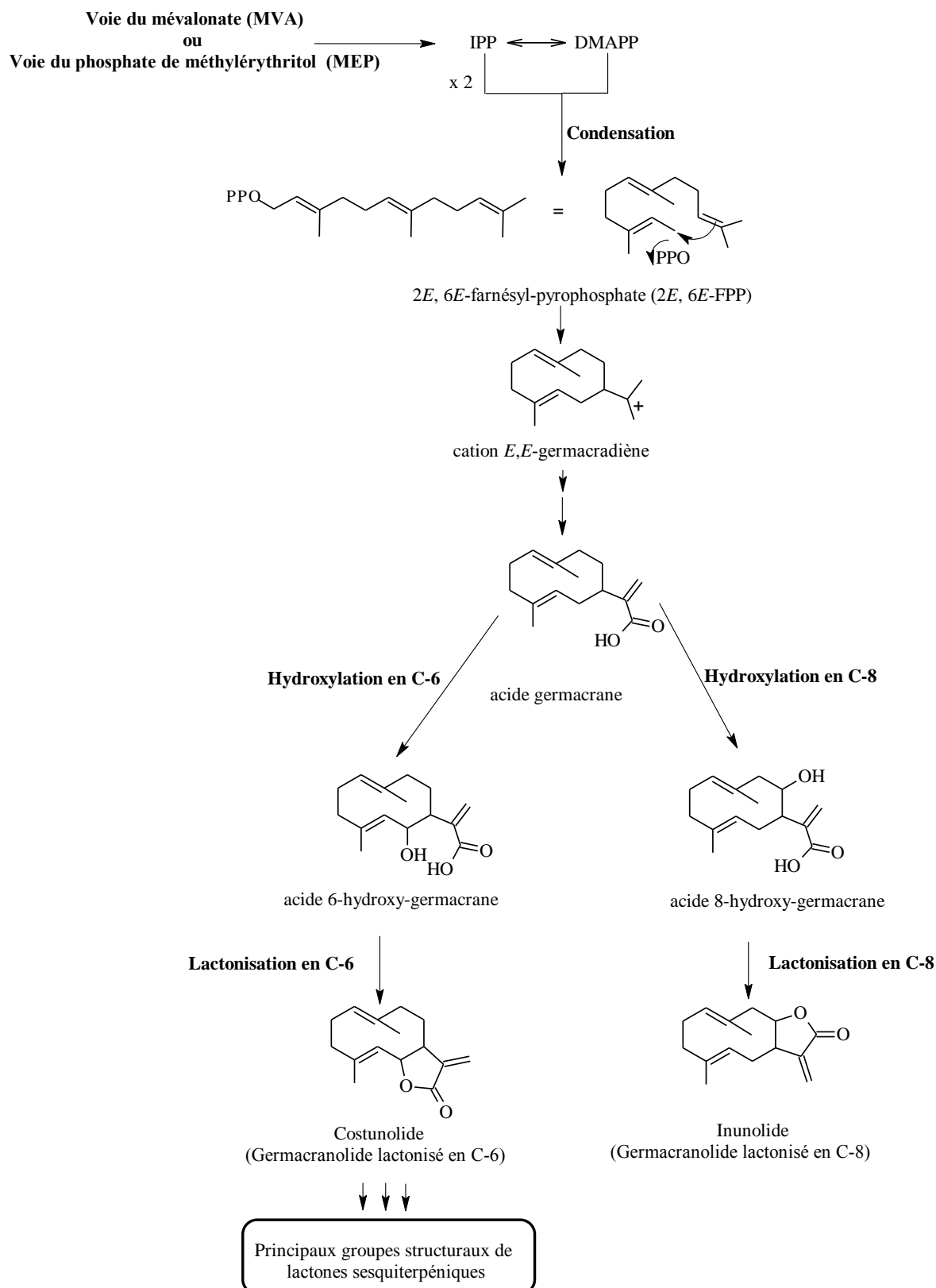


Figure 28 : Schéma de biogénèse des sesquiterpènes lactones.



### III. 4. Modifications structurales des STLs

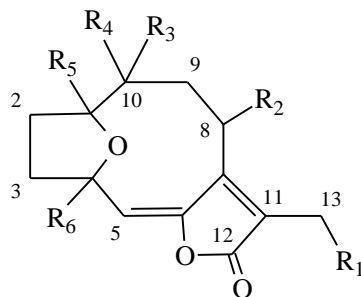
Les lactones sesquiterpéniques présentent très fréquemment un groupe méthylène en position  $\alpha$  de la lactone qui peut être endo- ou exocyclique. Cette double liaison en  $\alpha$  d'une fonction carbonyle est un motif clé de ce type de molécules et leur confère une haute réactivité associée à de nombreuses propriétés biologiques en réagissant comme un motif électrophile accepteur de Michael (voir chapitre III.6.2) (Chadwick *et al.*, 2013 ; Picman 1986). Cette classe de métabolites secondaires subit des modifications structurales telles que l'incorporation de fonctions hydroxyles ou de chaînes latérales estérifiées ainsi que d'époxydes (Fischer *et al.*, 1979 ; Picman 1986). Plus rarement elles peuvent être glycosylées (Takayanagi *et al.*, 2003), halogénées (Gan *et al.*, 2009) ou sulfatées (Xia *et al.*, 2010 ; Picman, 1986).

### III. 5. Esters de piptocarphol/piptocarphines ou hirsutinolides

#### III. 5.1. Généralités

Parmi les molécules isolées de l'espèce *P. spicatus*, la plupart sont des lactones sesquiterpéniques de types germacranolides, dont près de la moitié sont de type hirsutinolide (voir II.4.3). Cela n'est pas surprenant puisque cette classe est uniquement présente chez la tribu Vernonieae (voir chapitre II.4.2).

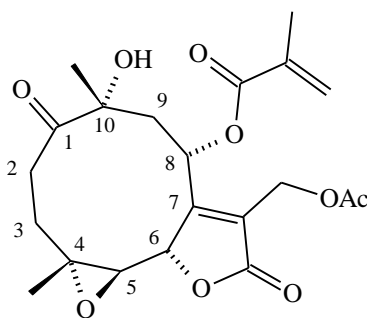
Les hirsutinolides sont des lactones sesquiterpéniques appartenant au sous-groupe des germacrolides (*E,E*) (Roberts et Bryson, 1984). Ils présentent un noyau germacrolide composé d'un cycle à 10 carbones, insaturé en C-5/C-6 (configuration *E*), ainsi qu'un pont éther-oxyde intracyclique entre C-1 et C-4 et d'un cycle lactonisé en C-6 (**Figure 29**). Le nom hirsutinolide a été proposé pour la première fois par F. Bohlmann en 1978 (Bohlmann *et al.*, 1978) en référence au noyau structural non oxygéné en C-8 et hydroxylé en C-13. Ce nom a été établi en référence à l'espèce *Vernonia hirsuta* (DC.) Sch. Bip var. *hirsuta* à partir de laquelle F. Bohlmann et son équipe ont isolé plusieurs composés dérivés (Bohlmann *et al.*, 1978). Depuis lors, les composés présentant ce noyau sont couramment nommés hirsutinolides dans la littérature, mais les termes de piptocarphines ou esters de piptocarphol peuvent aussi être retrouvés puisque ce type de composés a été isolé du genre *Piptocarpha* (Cowall *et al.*, 1981 ; Bardón *et al.*, 1988). Plus récemment certains hirsutinolides sont nommés vernolides, bien que ce terme ne semble pas représenter une famille structurale homogène mais plutôt en ensemble de molécules isolées des espèces de *Vernonia* (Toyang et Verpoorte, 2013 ; Chea *et al.*, 2006).



**Figure 29 :** Structure générale des hirsutinolides

### III. 5.2. Biosynthèse et mécanisme de formation

Il a été suggéré dans la littérature que les hirsutinolides puissent ne pas être des composés naturellement présents dans les végétaux. Ce seraient des artéfacts d'isolement formés à partir du glaucolide A (structure **Figure 30**) contenu dans la plante, au contact de la silice, à température ambiante, durant les procédés de séparation des composés (Martínez-Vázquez *et al.*, 1992). Cette hypothèse de formation des hirsutinolides à partir du Glaucolide A a été vérifiée expérimentalement par la même équipe en mettant en présence des solutions éthanoliques et méthanoliques de glaucolide A avec du gel de silice à température ambiante et après agitation. Dans les deux cas, l'équipe de recherche a bien observé la formation d'hirsutinolides et suggère que cette dernière passe par des interactions acide-base entre le gel de silice (acide) et - soit par l'ouverture de l'époxyde en C-4/C-5 suivi d'une attaque nucléophile sur le carbonyle en C-1, - soit *via* le départ du groupement acétate en C-13 du glaucolide A. Cette théorie est par ailleurs appuyée dans l'article par le fait que des espèces végétales contenant des glaucolides sans fonction époxyde en C-4/C-5 ou C-1/C-10 et/ou aucune fonction carbonyle en C-1 ne contenaient pas d'hirsutinolides.



Glaucolide A

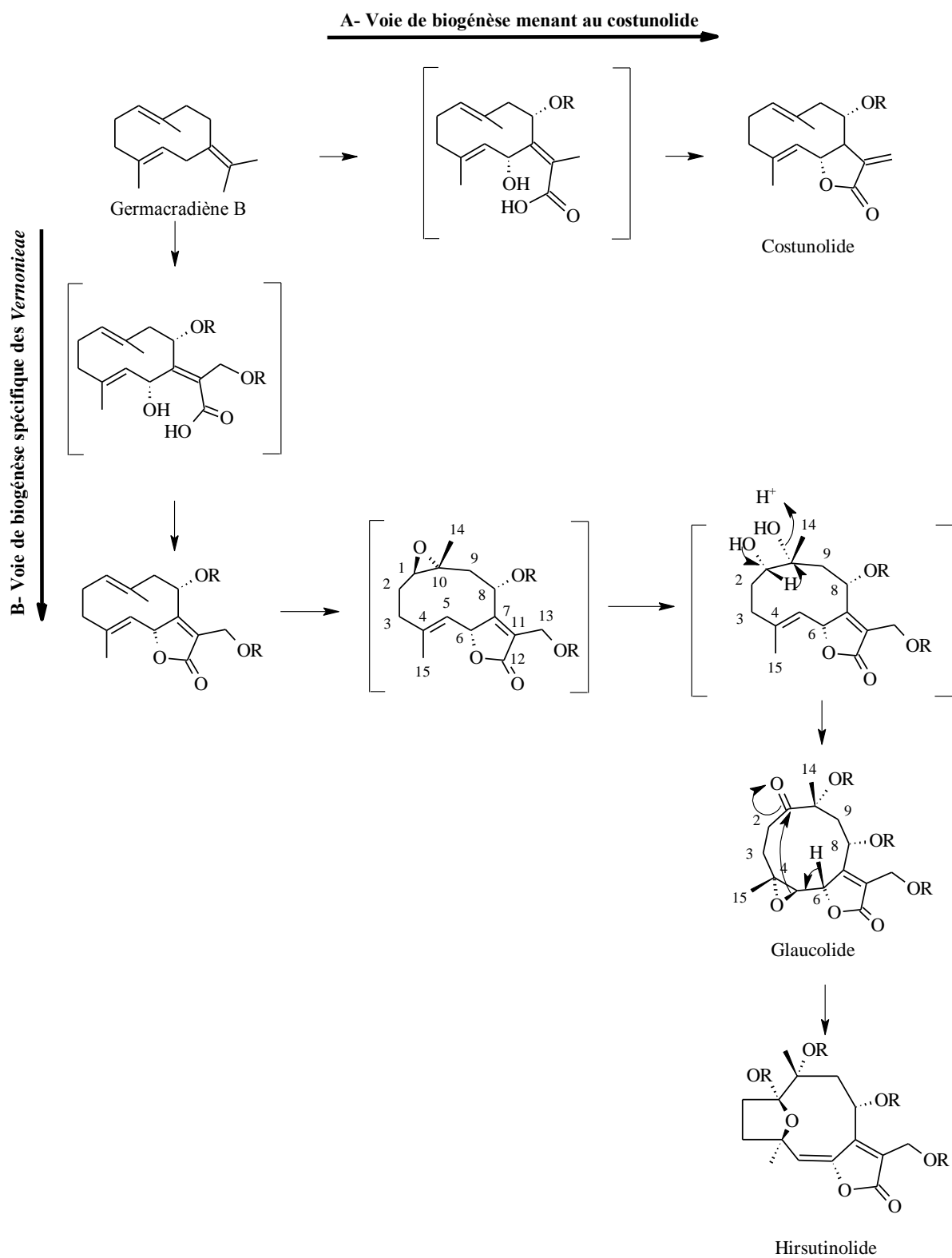
**Figure 30 :** Structure du glaucolide A

Mais cela peut aussi signifier que ce glaucolide est le précurseur biogénétique des hirsutinolides, comme cela a été envisagé par Bohlman et son équipe (Bohlmann et Jakupovic, 1990) qui proposent une hypothèse de biogénèse. Cette dernière interviendrait au

sein de la tribu des Vernonieae, conduisant aux hirsutinolides par un intermédiaire de type glaucolide (**Figure 31**) (Bohlmann et Jakupovic, 1990).

Par ailleurs l'équipe d'Appezato da Gloria a montré dans une étude publiée en 2012 que deux espèces d'Asteraceae, *Chrysolaena platensis* et *C. obovata*, séquestraient des hirsutinolides au sein de leurs trichomes. Cette mise en évidence a été possible par un prélèvement direct des poils à la pince, qui ont été solubilisés ensuite dans l'acétonitrile avant d'être soumis à analyses par HPLC-DAD-MS sur une colonne C18. Les auteurs ont précisé qu'ils n'avaient fait usage ni de silice ni de solvants protiques dans leur étude et concluent que les hirsutinolides sont bien des marqueurs chimiotaxonomiques des espèces étudiées (Appezato-da-Glória *et al.*, 2012). D'autres auteurs ont fait état dans la littérature de l'isolement de ce type de métabolites secondaires sans avoir utilisé de silice, méthanol ou éthanol durant les procédés d'extraction et d'isolement (Kos *et al.*, 2006 ; Buděšínský *et al.* 1994).

Les hirsutinolides (ainsi que les glaucolides) sont considérés comme des marqueurs chimiques du genre *Vernonia* (Appezato-da-Glória *et al.*, 2012). Il apparaît donc que les deux hypothèses sont envisageables, puisqu'elles ont été toutes deux démontrées. Les hirsutinolides sont donc bien naturellement présents au sein des espèces végétales, mais ils peuvent également provenir, dans certaines conditions, des procédés d'extraction et d'isolement. On peut cependant s'interroger sur le fait que dans de telles conditions, ils puissent raisonnablement être considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques.



**Figure 31** : Schéma de biogénèse hypothétique des hirsutinolides

### **III. 6. Propriétés biologiques des STLs**

Comme évoqué précédemment l'importante activité biologique des lactones sesquiterpéniques est liée à leur fonction initiale de protection au sein de la plante. Leur accumulation ainsi que leur diversification constituent pour le végétal une défense très efficace et à large spectre.

#### **III. 6.1. Propriétés des STLs au sein de la plante**

Les lactones sesquiterpéniques sont connues pour être des composés amers. Cette amertume est souvent corrélée à d'autres propriétés anti-appétentes, c'est-à-dire modifiant le comportement de l'animal, le dissuadant de s'alimenter, vis-à-vis des insectes broyeurs, des oiseaux, mais aussi des herbivores (Chadwick *et al.*, 2013).

Certains composés, au contraire, vont permettre d'attirer les prédateurs des parasites, assurant ainsi la défense de la plante de manière indirecte. Ces molécules ont aussi des propriétés antimicrobiennes, particulièrement reconnues au sein de la famille des Asteraceae, par modification de la membrane cellulaire de l'organisme agresseur, bactérie et même champignon phytopathogène. Les conditions atmosphériques et géologiques semblent également réguler la synthèse des lactones sesquiterpéniques.

Ces métabolites secondaires agissent également comme des composés allélopathiques<sup>4</sup>. Cet effet peut être délétère par exemple pour la germination ou la croissance d'autres espèces à proximité de la plante sécrétant des lactones sesquiterpéniques, mais d'autres cas sont possibles.

La concentration en lactone sesquiterpéniques varie en fonction du stade de développement de la plante et des conditions environnementales. Par exemple, au moment de la floraison, une espèce végétale aura tendance à augmenter la production de ces composés afin de se protéger pendant cette phase de reproduction énergétiquement coûteuse. Ce genre de paramètres est à prendre en compte en agriculture, en considérant la culture d'espèces alimentaires d'Asteraceae (Price *et al.*, 1990), lorsque le contrôle de l'amertume de la plante est important. De même l'allélopathie est désormais utilisée comme méthode naturelle à visée herbicide, voire insecticide et ces paramètres sont donc importants dans la mise en place d'une agriculture raisonnée sur l'ensemble de l'année (Narwal et Haouala, 2013 ; Farooq *et al.*, 2011).

Enfin, dans le cas d'études phytochimiques de ce type de métabolites secondaires, ces considérations doivent être prises en compte pour le choix de la période de récolte, de préférence au moment de la floraison afin d'augmenter le rendement d'extraction des STLs.

---

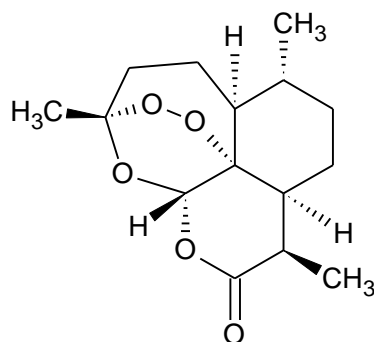
<sup>4</sup> L'allélopathie se définit comme «tout effet direct ou indirect, positif ou négatif, d'une plante (micro-organismes inclus) sur une autre par le biais de composés biochimiques libérés dans l'environnement (atmosphère et sol)» (Rice, 1984)

### III. 6.2. Propriétés biologiques et thérapeutiques des STLs

L'une des premières propriétés biologiques attribuées aux lactones sesquiterpéniques est leur cytotoxicité, sans doute liée à leur rôle protecteur au sein de la plante (Schmidt, 1999) (voir III.6.1). Elles ont également une forte propension à induire des allergies ou des dermatites de contact (Picman, 1986).

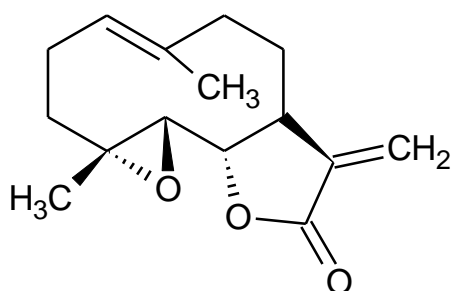
Au-delà de cette cytotoxicité, les lactones sesquiterpéniques possèdent un très large panel d'activités biologiques, s'exerçant généralement à de très faibles concentrations, comprises entre le nanomolaire et le millimolaire, voire plus basses (Schmidt, 1999). Ont ainsi été rapportées des propriétés antitumorales, antibactériennes, antifongiques, antiparasitaires qui ont été compilées en 1986 par Picman (Picman 1986). En 2012, Schmidt *et al.* ont recensé les métabolites secondaires prometteurs dans le traitement de maladies parasitaires tropicales négligées (Schmidt *et al.*, 2012). Plus de 80 lactones sesquiterpéniques figurent parmi ces composés, notamment certains germacranolides. Le parthénolide, le costunolide et l'eupatoriopicroine en sont quelques exemples. La plupart des propriétés biologiques de ces molécules, que ce soient les propriétés antiparasitaires mais aussi la cytotoxicité, sont corrélées le plus souvent à la présence des même motifs structuraux : les groupements  $\alpha,\beta$ -insaturés (Schmidt et Heilmann, 2002 ; Schmidt *et al.*, 2009). Les motifs  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone ou cyclopentenone  $\alpha,\beta$ -insaturée sont parmi les plus fréquents et les plus réactifs (Schmidt et Heilmann, 2002). Les motifs accepteurs de Michael sont particulièrement représentés chez les STLs par rapport à d'autres classes de molécules et sont impliqués dans des réactions d'additions avec des molécules nucléophiles biologiques, particulièrement les résidus cystéines (Kupchan *et al.*, 1970 ; Schmidt, 2006).

L'addition de Michael n'est pas le seul mécanisme responsable de l'activité biologique de cette classe de métabolites secondaires. C'est le cas par exemple de l'artémisinine, une lactone sesquiterpénique aux propriétés antipaludiques, initialement isolée de la plante *Artemisia annua* L., espèce d'*Asteraceae* utilisée en médecine traditionnelle chinoise pour la même indication (Graziose *et al.*, 2010). L'artémisinine exerce son activité grâce au motif endoperoxide du cycle 1,2,4-trioxane présent au sein de sa structure (**Figure 32**). Son mécanisme d'action fait encore l'objet de débats, mais elle agirait comme une prodrogue, subissant une réduction *via* le  $\text{Fe}^{2+}$  de l'hème conduisant au clivage homolytique de l'endoperoxyde, conduisant à la libération d'espèces radicalaires. L'effet antiparasitaire proviendrait de la réaction de ces espèces avec diverses protéines du parasite, induisant des dommages cellulaires (Klonis *et al.*, 2013).



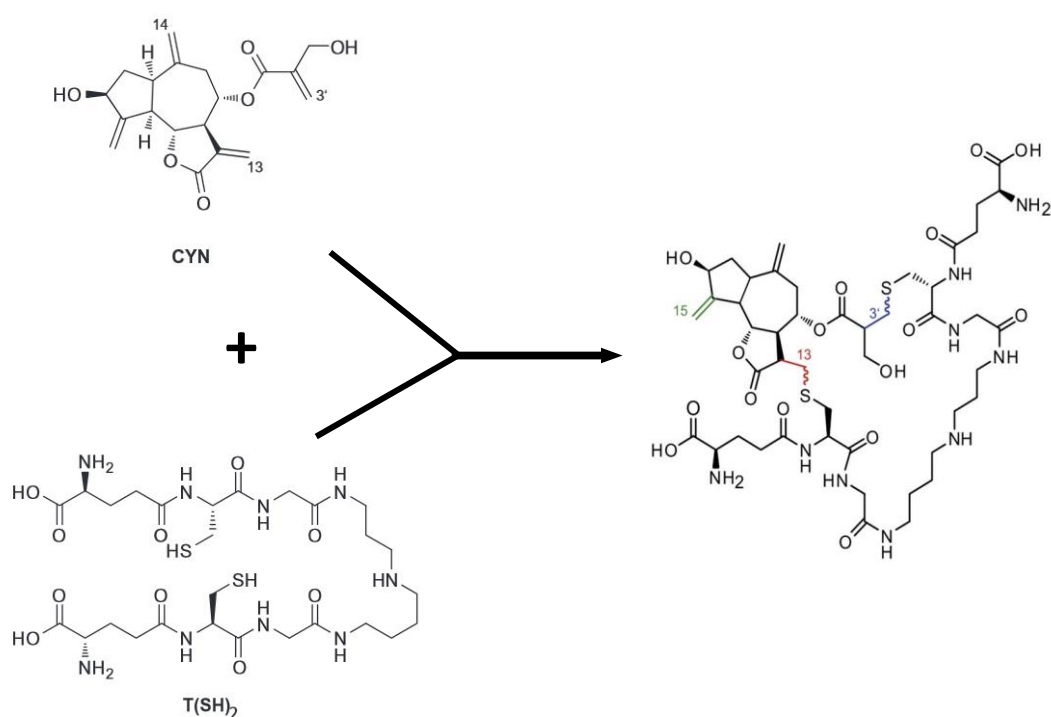
**Figure 32** : Structure de l'artémisinine

L'un des exemples le plus représentatif du potentiel thérapeutique de cette classe de composés est peut-être le parthénolide (**Figure 33**). Le parthénolide est un germacranolide principalement isolé de la Grande Camomille, *Tanacetum parthenium* (Asteraceae) et qui possède dans sa structure un motif  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone. Cette molécule est particulièrement intéressante pour ses propriétés anticancéreuses et anti-inflammatoires, ce qui est le cas pour le grand groupe des lactones sesquiterpéniques plus généralement (Merfort, 2011 ; Zhang *et al.*, 2005 ; Ghantous *et al.*, 2010). Mathema *et al.* ont publié en 2011 un article récapitulant ses différentes cibles biologiques justifiant un avenir prometteur dans ces deux affections dont il a été démontré qu'elles étaient étroitement liées (Perwez *et al.*, 2007). Le parthénolide agit tout d'abord comme anti-inflammatoire par inhibition de la voie NF $\kappa$ B à plusieurs niveaux (Mathema *et al.*, 2011). Ses propriétés anticancéreuses proviennent notamment de cette inhibition mais aussi de sa capacité à augmenter la production de ROS (Espèces Réactives Oxygénées) au sein des cellules cancéreuses et à inactiver la voie des STAT, facteurs de transcription impliqués dans la prolifération cellulaire (Mathema *et al.*, 2011). Par ailleurs le parthénolide possède également des propriétés antiparasitaires intéressantes. Il a été démontré qu'il inhibait sélectivement les parasites *Leishmania amazonensis* et *Trypanosoma cruzi* lors de tests réalisés *in vitro* (Tiuman *et al.*, 2005 ; 2014 ; Izumi *et al.*, 2008). Le parthénolide est capable d'activer la voie Keap1/Nrf2/ARE (Umemura *et al.*, 2008 ; Wu *et al.* 2010) de la même façon que d'autres molécules possédant un motif  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone (Le Lamer *et al.*, 2014).



**Figure 33** : Structure du parthénolide

La cynaropicrine est une molécule naturelle isolée de *Centaurea salmantica* L. (Asteraceae) inhibant la croissance de *T. brucei rhodesiense* *in vitro* et *in vivo* (Zimmermann *et al.*, 2012). Il a été démontré que cette lactone sesquiterpénique était capable de bloquer le système redox trypanothione du parasite en se liant à la trypanothione réduite. La molécule se lie par ces deux motifs accepteurs de Michael au niveau des deux fonctions sulfhydryles de la molécule (**Figure 34**) (Zimmermann *et al.*, 2013). Cette réaction peut expliquer l'activité trypanocide de la molécule.



**Figure 34** : Formation d'un bi-adduit entre la cynaropicrine (CYN) trypanocide et la trypanothione sous sa forme réduite (TSH)<sub>2</sub> (schéma tiré de Zimmermann *et al.*, 2013)



### **III. 7. Conclusion partielle**

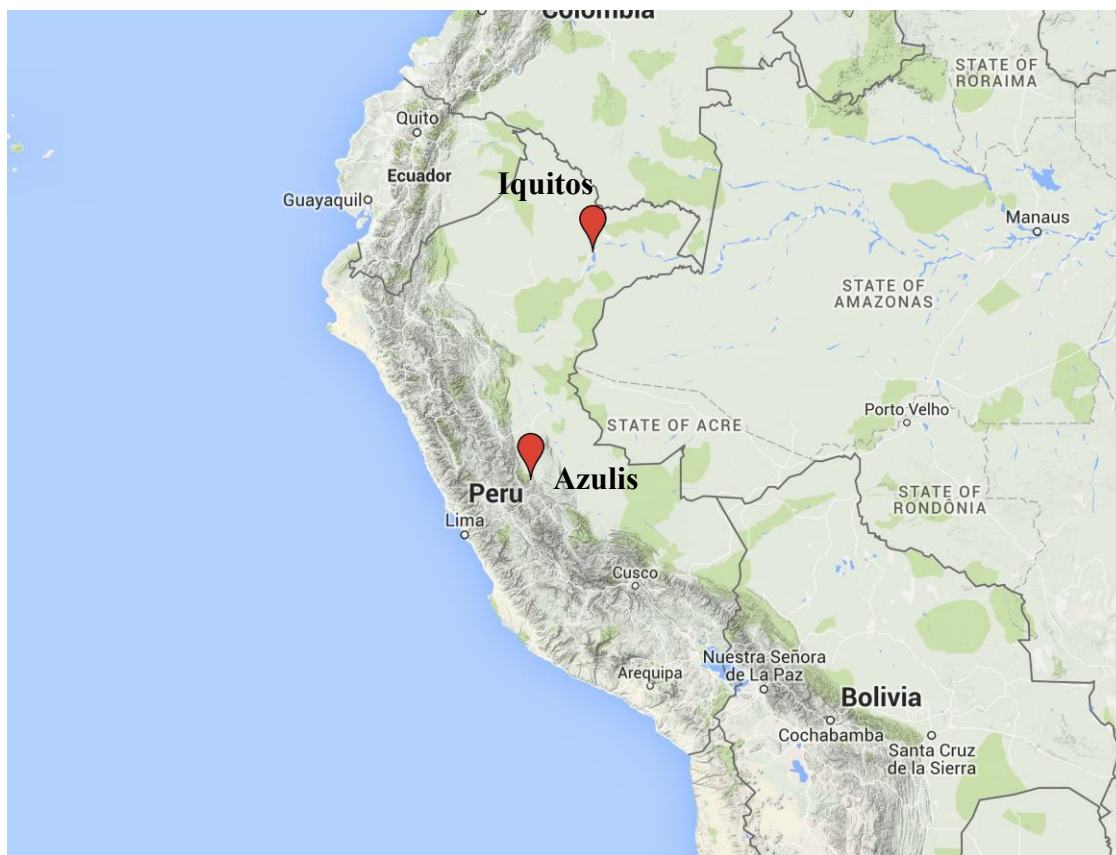
La grande diversité structurale des STLs et leurs nombreuses propriétés thérapeutiques font que cette classe de composés continue d'être très étudiée aujourd'hui. Le fait que la cytotoxicité et les propriétés biologiques de ces composés soient portées par les mêmes pharmacophores rend difficile la prédiction de la sélectivité, comme cela a déjà été souligné pour les accepteurs de Michael (voir chapitre I.2). Comme la réactivité, elle semble être modulée par d'autres facteurs, notamment par la lipophilie, la géométrie et l'environnement électronique des molécules (Ghantous *et al.*, 2010). La recherche de nouvelles STLs par bio-guidage continue donc d'être une voie d'accès privilégiée dans la recherche de nouveaux composés actifs pouvant mener à terme au développement d'agents thérapeutique.



## **Partie B - TRAVAUX PERSONNELS -**



Les lots de *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist ont été récoltés au Pérou à partir d'une parcelle de culture identifiée de la réserve nationale protégée Allpahuayo-Mishana, située dans la région du Loreto, près d'Iquitos. Quatre lots ont été récoltés en avril (**lot A**) et juillet 2011 (**lot B**), en juillet 2012 (**lot C**) et enfin en mai 2013 (**lot E**). Un cinquième lot (**lot D**) a été récolté dans le secteur d'Azulis, au Pérou, en août 2011 (**Figure 35**).



**Figure 35** : Lieux de récolte de *P. spiralis* au Pérou.

Les **lots A, B, C et E** ont été récoltés à Iquitos et le **lot E** dans le secteur d'Azulis.

L'espèce *P. spiralis* n'a jamais fait l'objet d'études phytochimiques jusqu'à présent. Elle a été choisie pour cette étude sur la base de critères chimiotaxonomiques, ethnopharmacologiques et des premiers essais de criblage réalisés sur ses extraits. Par ailleurs elle présente l'avantage d'être une herbacée invasive dont la collecte ne porte pas préjudice au biotope. Elle n'appartient pas à la liste des espèces protégées par la CITES (PNUE-WCMC, 2014). Elle fleurit et fructifie tout au long de l'année, limitant a priori les variabilités saisonnières quant à sa composition chimique.

Les tests de criblage *in vitro* ont été réalisés sur les parasites responsables de la leishmaniose. Ce choix a été motivé par deux travaux publiés par G. Odonne et collègues. Le premier traite de l'usage traditionnel de la seconde espèce du genre *Pseudelephantopus*, *P. spicatus*, dans le traitement de la leishmaniose cutanée au sein d'une communauté amazonienne péruvienne

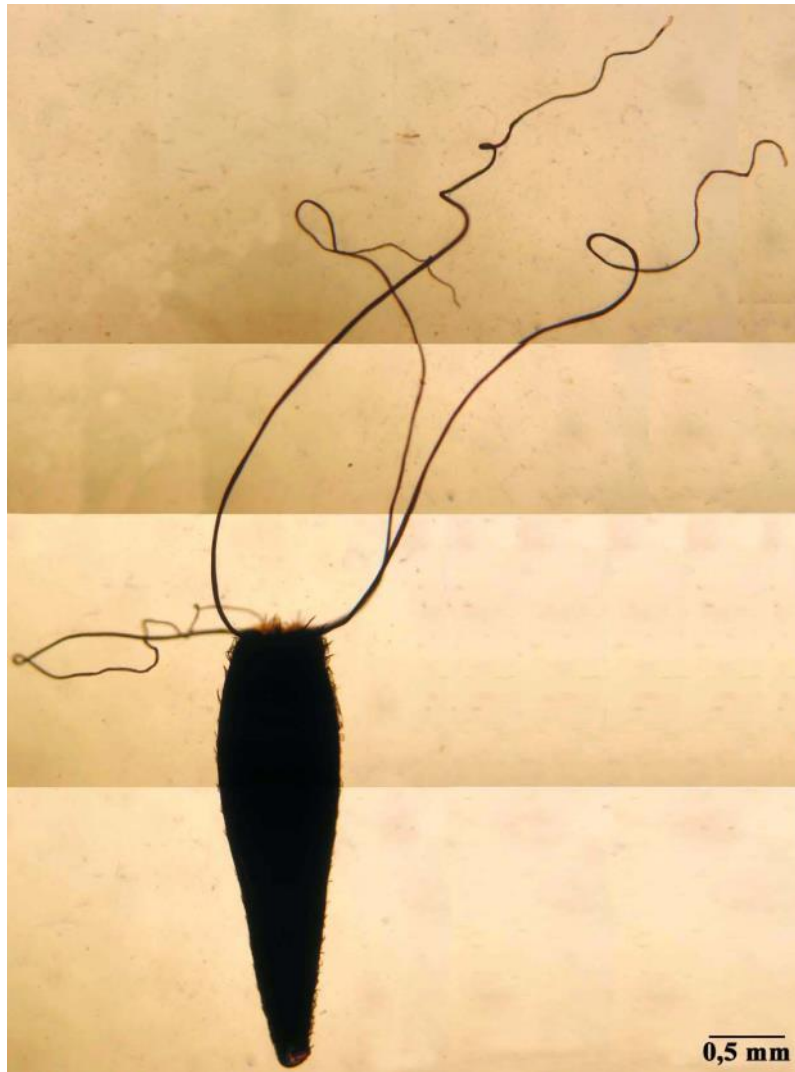
(Odonne *et al.*, 2013). Le deuxième article décrit l'isolement de deux lactones sesquiterpéniques fortement leishmanicides et sélectives, à partir des parties aériennes de la plante (Odonne *et al.*, 2011). Les modèles biologiques de criblage *in vitro* choisis ont donc été des parasites du genre *Leishmania*. Les premiers tests de criblage ont été effectués à Lima au Pérou, sur amastigotes axénique de l'espèce *L. amazonensis*, responsable de la leishmaniose cutanée. Les autres tests ont été poursuivis sur l'espèce *L. infantum* (promastigotes et amastigotes axéniques), agent de la leishmaniose viscérale pour des questions pratiques, s'agissant du modèle en cours dans l'unité PHARMA-DEV. Ces essais utilisent des parasites transfectés pour le gène codant pour la luciférase.

## **I. Étude morphologique de *P. spiralis***

En vue de fournir des éléments d'identification fiable de la drogue végétale, l'étude morphologique du fruit et de la feuille de *P. spiralis* ainsi que l'étude microscopique de la section transversale de la feuille et de la poudre de ses parties aériennes sèches pulvérisées, ont préalablement été réalisées sur les **lots A et B**.

### **I. 1. Morphologie du fruit**

Le fruit de *P. spiralis* est un akène pubescent de 2,5 à 3 mm de long (**Figure 36**) qui présente un pappus formé de longues soies fortement spiralées conformément à la description fournie au paragraphe II.3.2.

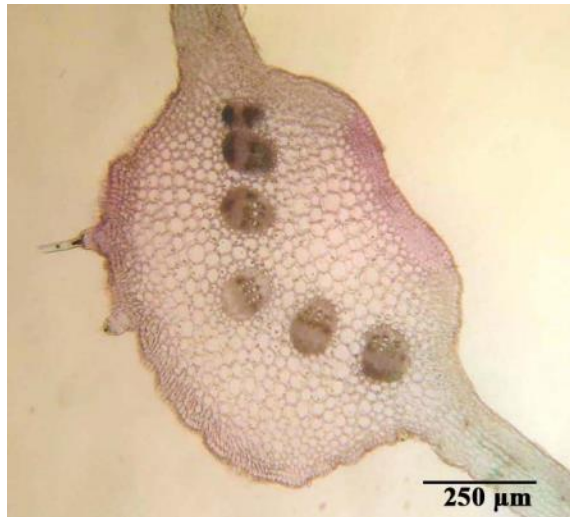


**Figure 36 :** *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist, fruit

## **I. 2. Section transversale de la feuille**

L'aspect général de la section transversale de la feuille est présenté dans la **Figure 37 (A-B)**. L'observation sous lumière polarisée fait apparaître les tissus lignifiés en surbrillance (bois, fibres péricycliques) et des cristaux d'oxalate de calcium de petite taille (agglomérés en macles). Les faisceaux conducteurs de la feuille présentent des formations secondaires organisées à partir d'une assise génératrice (Liber II, Bois II), caractéristiques des dicotylédones. Il est à remarquer :

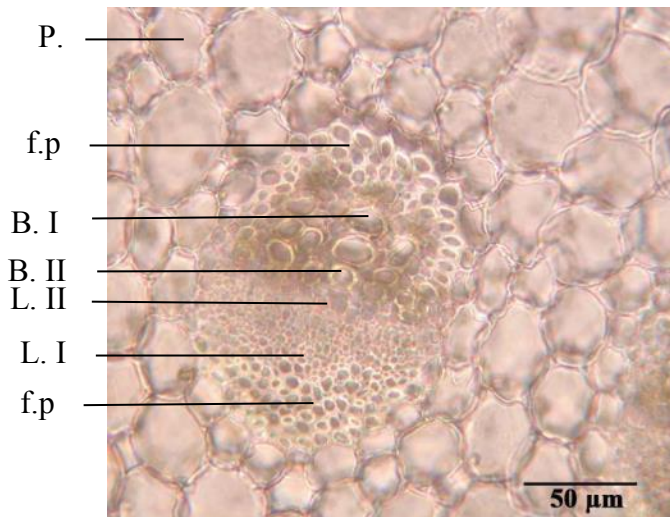
- l'organisation du système conducteur en une succession de faisceaux (5 à 7) libéro-ligneux distincts et non d'un arc continu
- la présence de poils sur les épidermes.



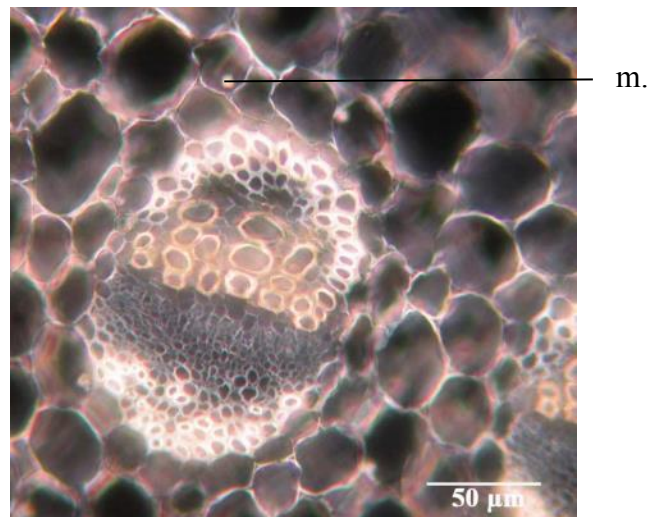
A



B



C



D

**Figure 37 :** *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist, feuille en section transversale

A-B : Allure générale

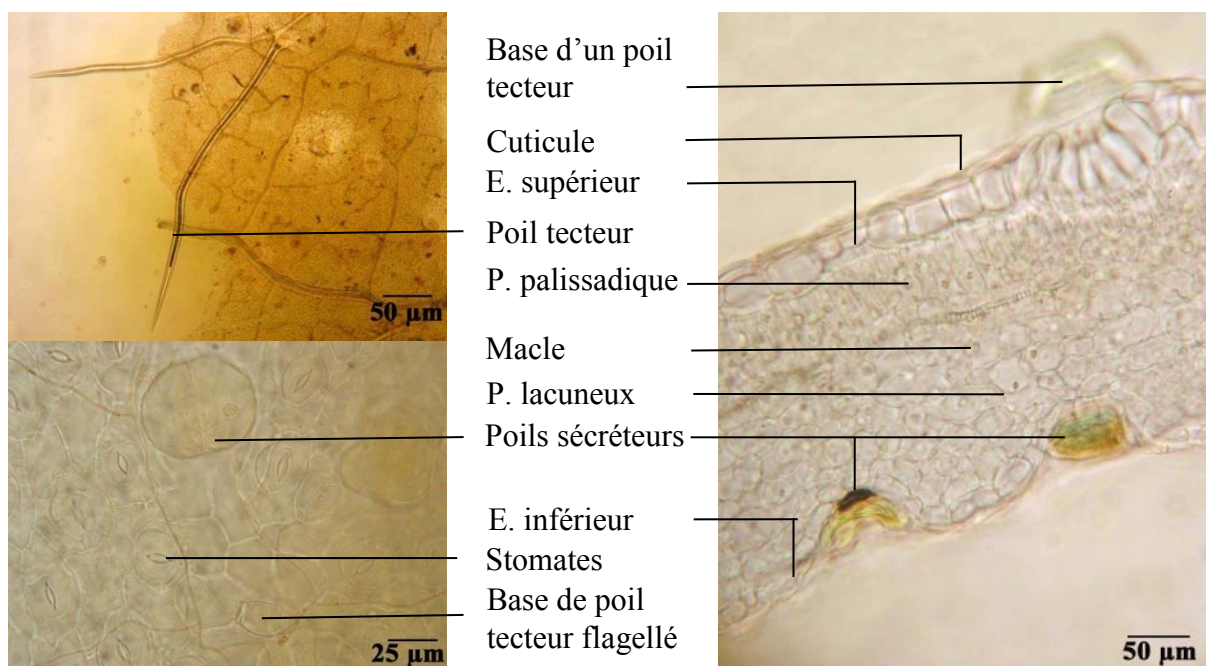
C-D : Détail d'un faisceau conducteur

P. : parenchyme ; f.p. : fibres péricycliques ; B. I : bois I ; B.II : bois II ; L. I : liber I ; L. II : liber II ;  
m. : macle



### I. 3. Analyse microscopique de la plante pulvérisée

*P. spiralis* contient à la surface de ses feuilles des poils tecteurs et sécréteurs (**Figure 38**). L'analyse microscopique de la plante pulvérisée révèle la présence de deux types de poils tecteurs foliaires : de longs poils unicellulaires d'environ 300 µm de long (**Figure 38** et **Figure 39**, A et B) et des poils tecteurs bicellulaires à pluricellulaires, plus petits, à apex « flagellé » (**Figure 39**, C et D). Les poils sécréteurs (**Figure 38** et **Figure 39**, E et F) sont situés dans un renflement de l'épiderme inférieur. Ils sont sessiles, pluricellulaires et bisériés, de type Asteraceae. L'épiderme supérieur est protégé par une cuticule. Les stomates sont de type anomocytique (**Figure 38**). Les parenchymes palissadique et lacuneux contiennent de nombreuses macles d'oxalate de calcium (**Figure 38**).

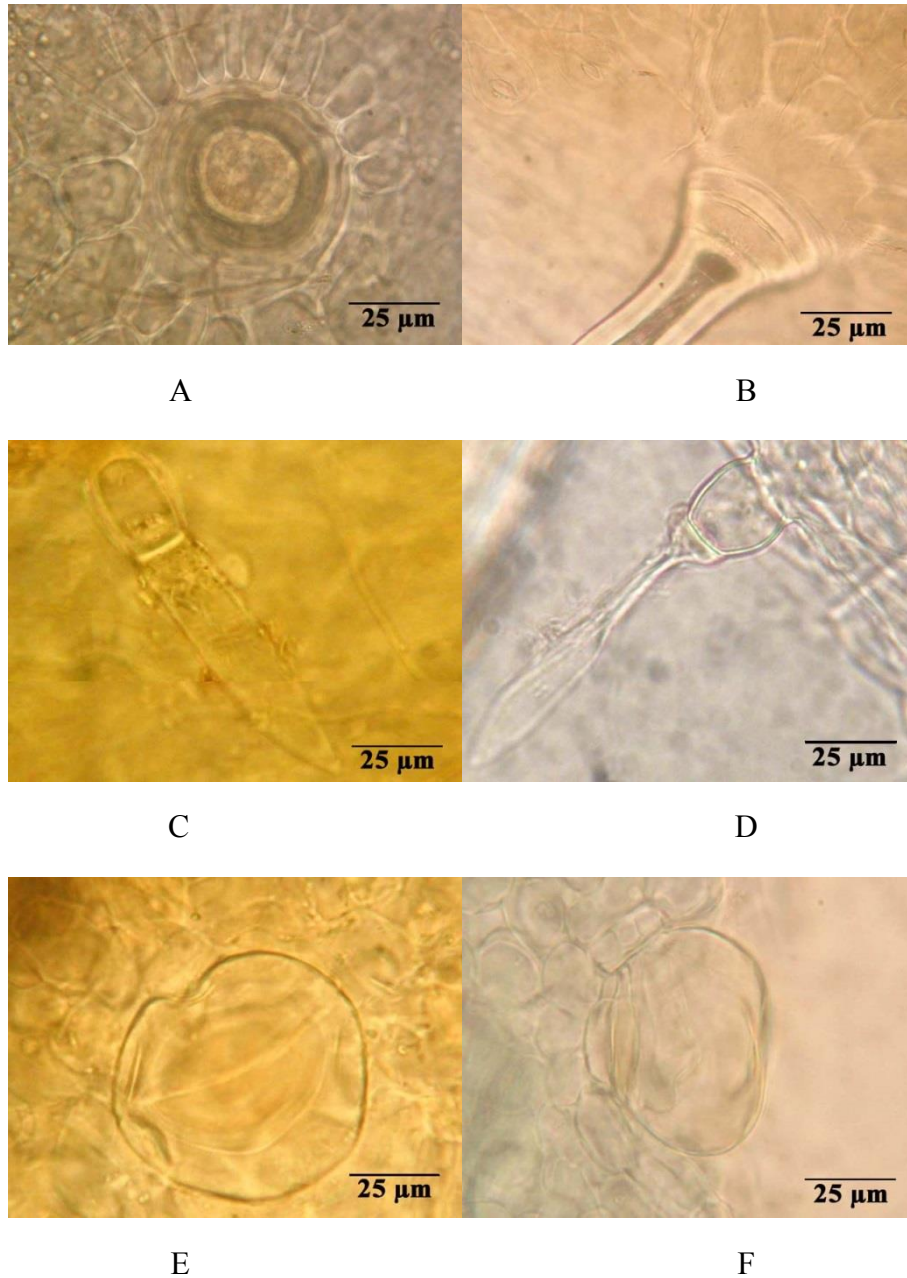


**Figure 38 :** *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist, poudre de feuilles

À gauche : épiderme vu de dessus

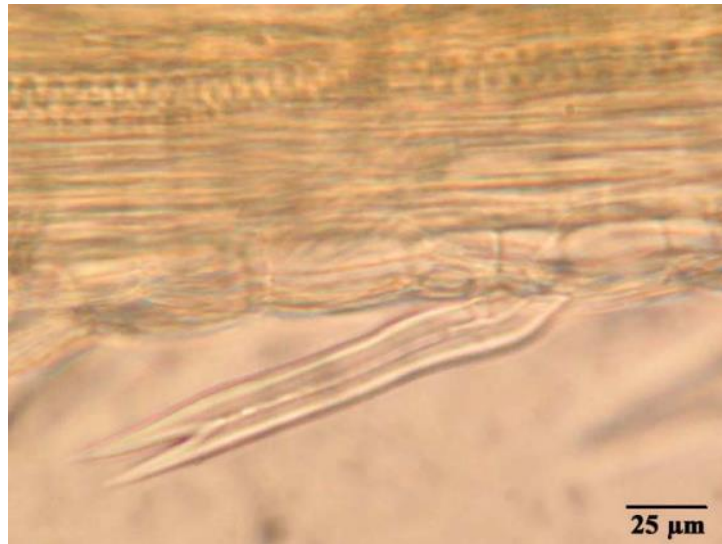
À droite : feuille en section transversale - Limbe de la feuille

P. : parenchyme ; E. : épiderme



**Figure 39 :** *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist, poudre de feuilles  
 Base d'un poil tecteur, vu de face (A), vu de profil (B)  
 Poil tecteur dit "flagellé" vu de face (C), vu de profil (D)  
 Poil sécréteur vu de face (E), vu de profil (F)

Le fruit présente de nombreux poils sécréteurs (non illustrés ici) de même type que ceux des feuilles (**Figure 39**, E et F) et de nombreux poils tecteurs bisériés à apex bifide (**Figure 40**). Le grain de pollen de *P. spiralis* est légèrement échinolophate (**Figure 41**), c'est à dire formé d'une sorte de réseau de crêtes entourant des zones de dépressions ou lacunes. Il comprend 3 pores.



**Figure 40** : *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist, poil tecteur bisérié du fruit



**Figure 41** : *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist, grain de pollen

## II. Extractions, fractionnements et purification des composés

### II. 1. Travaux préliminaires : criblage de l'activité biologique

#### II. 1.1. Tests biologiques sur les extraits éthanoliques des lots A et B

Des extraits éthanoliques ont été préparés à partir des différentes parties de *P. spiralis* issues des **lots A et B**. Elles ont été séparées, séchées, réduites en poudre, puis extraites par macération dans de l'éthanol à 96°, à température ambiante, pendant 48 h. Le criblage des extraits obtenus a été réalisé *in vitro* sur des parasites au stade amastigote axénique de *Leishmania amazonensis*, agent de la leishmaniose cutanée. Ces résultats préliminaires sont présentés dans le **Tableau 7**.

**Tableau 7** : Activités leishmanicides des extraits des différentes parties de *P. spiralis* issus des deux premières collectes (**lots A et B**)

Extraits éthanoliques des différentes parties de <i>P. spiralis</i>	CI <sub>50</sub> (µg/mL) sur <i>L. amazonensis</i> *	
	Lot A	Lot B
Fleurs	0,5	2,2
Feuilles	0,2	0,9
Tiges/racines	8,0	>50
Tiges	-	>50
Racines	-	>50

\*L'activité a été mesurée *in vitro* sur amastigotes axéniques de *L. amazonensis* par spectrophotométrie (voir Matériel et Méthodes).

Les extraits éthanoliques des fleurs et des feuilles ont présenté une excellente activité leishmanicide sur le modèle, avec des valeurs de CI<sub>50</sub> largement inférieures à 10 µg/mL (Osorio *et al.*, 2007). Cela nous a conduits à réaliser l'étude phytochimique des parties aériennes de *P. spiralis* en vue d'isoler des lactones sesquiterpéniques potentiellement responsables de cette activité.

#### II. 1.2. Tests biologiques sur les extraits aqueux et éthanolique du lot E

Un extrait aqueux a été réalisé à partir des parties aériennes du **lot E** afin d'avoir un extrait proche, en terme de composition chimique, de la décoction traditionnelle. Pour ce faire, les parties aériennes de la plante, réduites en poudre, ont été infusées avec de l'eau distillée bouillante pendant 20 min (jusqu'à refroidissement). L'extrait a été congelé puis lyophilisé afin d'obtenir un résidu sec.

L'extrait aqueux ainsi obtenu a été testé pour ses propriétés leishmanicides sur promastigotes de *L. infantum*, par mesure de l'activité luciférase, mais aussi antipaludiques sur *P. falciparum* FcM29, du fait de l'usage traditionnel de la plante dans cette indication (voir A.II.3.4.1). La cytotoxicité a également été évaluée par un test MMT sur macrophages, ces cellules étant les cellules hôtes des leishmanies chez les mammifères, mais aussi sur une lignée cellulaire saine de reins de singe, les cellules VERO. Parallèlement, un extrait éthanolique du même **lot E** a été préparé par macération dans de l'éthanol à 96° durant 48 h afin de comparer leurs activités. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 8**.

**Tableau 8** : Activités biologiques des extraits aqueux et éthanolique issus des parties aériennes du **lot E**

Extraits du lot E	CI <sub>50</sub> (µg/mL) <i>L. infantum</i> *	CC <sub>50</sub> (µg/mL) Macrophages***	CI <sub>50</sub> (µg/mL) <i>P. falciparum</i> FcM29**	CC <sub>50</sub> (µg/mL) VERO***
H <sub>2</sub> O	13,4 ± 2,6	1,0 ± 0,2	3,0 ± 0,6	1,7 ± 0,8
EtOH	> 50	ND	21,1 ± 1,2	2,5 ± 1,0

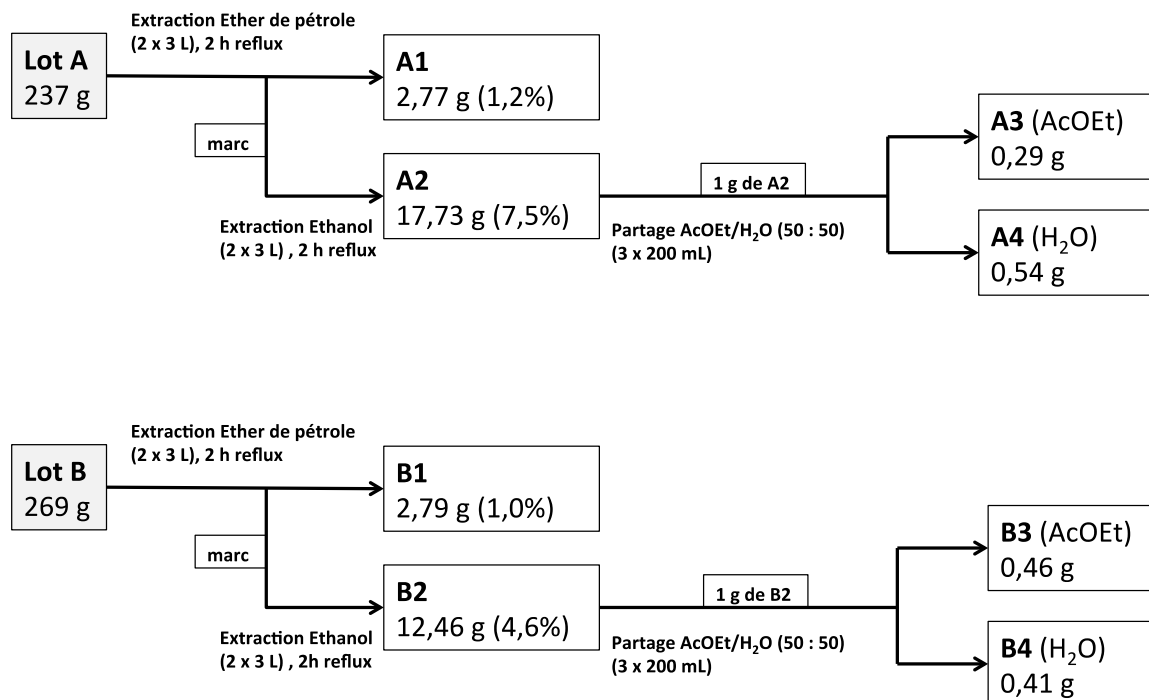
\*L'activité leishmanicide a été évaluée *in vitro* sur les parasites au stade promastigote de *L. infantum*, par mesure de l'activité luciférase. \*\*L'activité antipaludique a été évaluée sur une souche de *P. falciparum* FcM29 résistante à la chloroquine, par mesure de la radioactivité après incorporation d'hypoxanthine tritiée. \*\*\*La cytotoxicité sur macrophages murins et sur cellules VERO a été évaluée par spectrophotométrie (voir Matériel et Méthode). ND : non déterminée.

On constate que l'extrait aqueux est plus actif que l'extrait éthanolique sur les deux modèles de parasites. Il inhibe efficacement *P. falciparum* étant donné sa valeur de CI<sub>50</sub> de 3 µg/mL. De plus, le système de score établi par Willcox et collègues (Willcox *et al.*, 2011) considère qu'un extrait de plante, en particulier aqueux, présentant une valeur de CI<sub>50</sub> comprise entre 2,0 et 5,0 en µg/mL, est généralement considéré comme actif et encourage la poursuite du fractionnement bioguidé. L'extrait éthanolique semble être plus actif vis-à-vis de l'agent du paludisme que de *L. infantum* même s'il demeure moins actif que l'extrait aqueux. Étrangement, l'extrait éthanolique du **lot E** ne semble pas inhiber la croissance du parasite *L. infantum* (CI<sub>50</sub> > 50 µg/mL) alors que les extraits éthanoliques des **lots A** et **B** avaient précédemment présenté une excellente activité (CI<sub>50</sub> < 1 µg/mL) sur *L. amazonensis*. Cela peut s'expliquer par une différence de sensibilité des espèces de leishmanies vis-à-vis de l'extrait. Cette variabilité inter-espèces vis-à-vis des traitements a déjà été démontrée dans de précédentes études (Croft *et al.*, 2006 ; Morais-Teixeira *et al.*, 2011). Cela peut également s'expliquer par des variations de sensibilité des méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité leishmanicide, par spectrophotométrie d'une part (*L. amazonensis*) et par une méthode de luminescence d'autre part (*L. infantum*), plus sensible (Sundar *et al.*, 2005). Également, cela peut être dû à une différence de la composition chimique des extraits éthanoliques des **lots A** et **B** par rapport à **E**.

### II. 1.3. Extraction des lots A et B

Les parties aériennes des **lots A** et **B** ont été extraites selon le même protocole (**Figure 42**), séparément. Chaque lot a été extrait dans un premier temps par 2 x 3 L d'éther de pétrole, sous reflux, pour donner **A1** et **B1**, respectivement. Le marc résiduel a de nouveau

été extrait pour chacun des lots par 2 x 3 L d'éthanol à 96°, sous reflux, pour donner **A2** et **B2**. Un partage liquide/liquide a été effectué sur 1 g de chacun des extraits éthanoliques **A2** et **B2** entre de l'acétate d'éthyle et de l'eau, donnant deux résidus AcOEt (**A3** et **B3**) et deux résidus aqueux (**A4** et **B4**).



**Figure 42** : Schéma du protocole d'extraction appliqué séparément aux **lots A et B** de *P. spiralis*

Les quatre extraits obtenus pour chacun des lots ont été testés sur le modèle d'amastigotes axéniques de *L. amazonensis* afin d'évaluer leurs activités biologiques. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 9**.

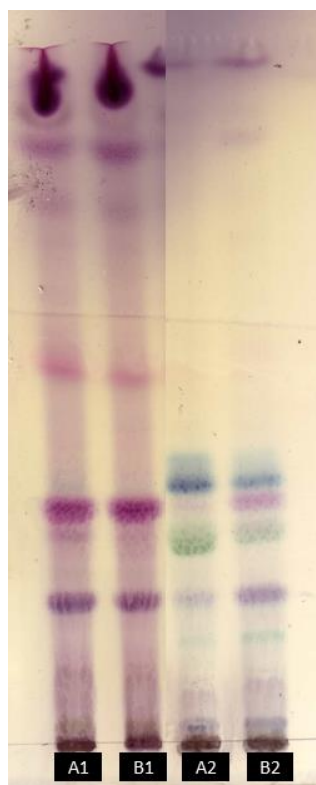
**Tableau 9** : Évaluation de l'activité leishmanicide *in vitro* des différents extraits issus des **lots A et B** sur modèle amastigote axénique de *L. amazonensis*.

Extraits	Références Extraits lot A	IC <sub>50</sub> (µg/mL)*	Références Extraits lot B	IC <sub>50</sub> (µg/mL)*
Ether de pétrole	A1	13,3	B1	17,0
Ethanolique	A2	57,7	B2	13,6
Acétate d'éthyle	A3	59,6	B3	38,0
Aqueux	A4	26,3	B4	29,0

\*L'activité a été mesurée par spectrophotométrie (voir Matériel et Méthodes).

Au sein des deux récoltes, les extraits éther de pétrole apparaissent être les plus actifs avec des valeurs de CI<sub>50</sub> de 13,3 µg/mL (**A1**) et 17,0 µg/mL (**B1**). Étrangement l'extrait éthanolique du **lot B** (**B2**) apparaît plus actif que celui du **lot A**. Une CCM comparative des extraits (**Figure 43**) semble indiquer qu'il contient le même profil chimique que **A2**, mais pas dans les mêmes concentrations, contrairement aux extraits **A1** et **B1**, de compositions

qualitative et quantitative très proches. Suite au partage liquide/liquide des extraits éthanoliques entre l'eau et l'acétate d'éthyle, les fractions aqueuses sont apparues être les plus efficaces. Aucun des différents extraits préparés selon ce protocole n'a présenté une aussi bonne activité que les extraits éthanoliques « totaux » préparés par macération dans l'EtOH à 96°, initialement criblés. Cela suggère un effet synergique de molécules de différentes polarités.



**Figure 43** : CCM comparative des extraits éther de pétrole des **lots A et B (A1 et B1)** et des extraits éthanoliques **A2 et B2**.

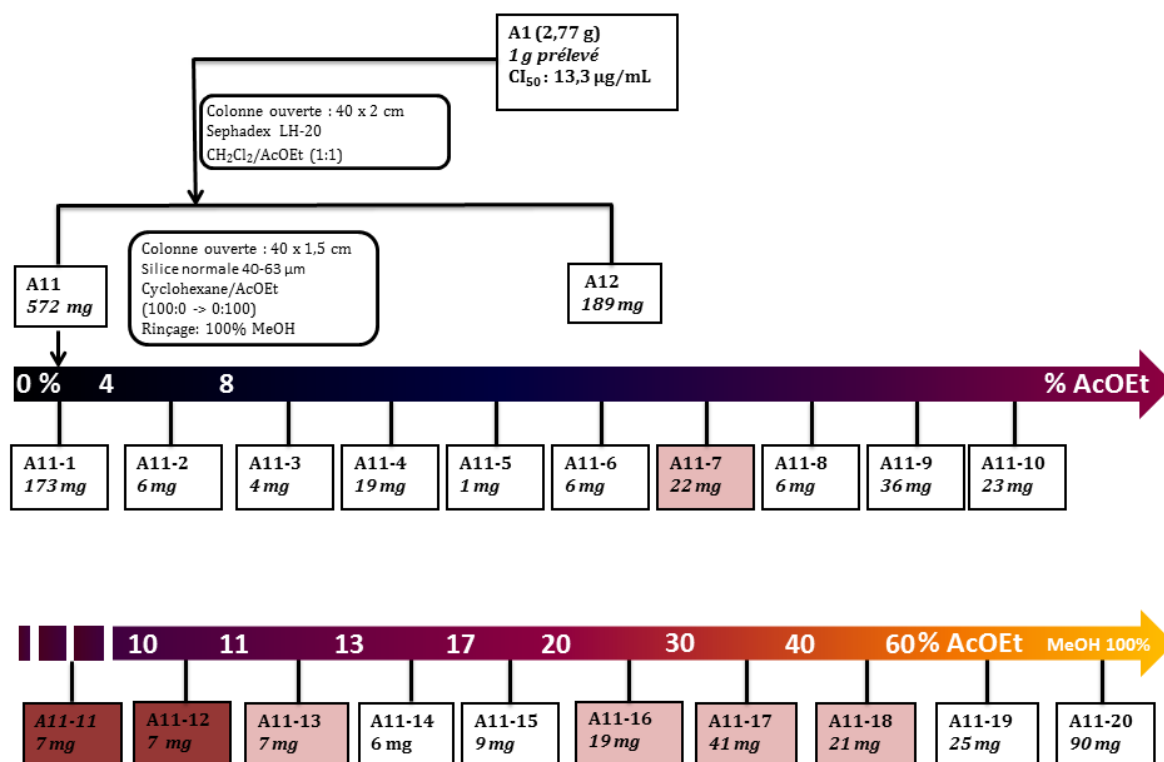
Dépôt 100  $\mu$ L. Solvant de migration : toluène/AcOEt (85:15, V/V),  
détection vanilline sulfurique

Étant donné le consensus sur l'activité des deux extraits éther de pétrole, il a été choisi de réaliser le fractionnement bioguidé de l'extrait éther de pétrole **A1** en priorité.

## II. 1.4. Fractionnement bioguidé de l'extrait A1

La **Figure 44** représente le schéma de fractionnement de l'extrait éther de pétrole **A1**. Un gramme de **A1** a été repris dans un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$  (1:1) et séparé sur du gel de Sephadex LH-20. Cette séparation a été peu concluante et a conduit à deux fractions peu différentes qualitativement **A11** (572 mg) et **A12** (189 mg). La fraction **A11** (572 mg) a ensuite été séparée sur silice normale. La séparation a conduit à 20 fractions (**A11-1** à **A11-20**) dont les masses respectives ont été reportées sur la **Figure 44**.





**Figure 44** : Fractionnement et bilan massique de l'extrait éther de pétrole **A1**, réalisé sur 1 g d'extrait.

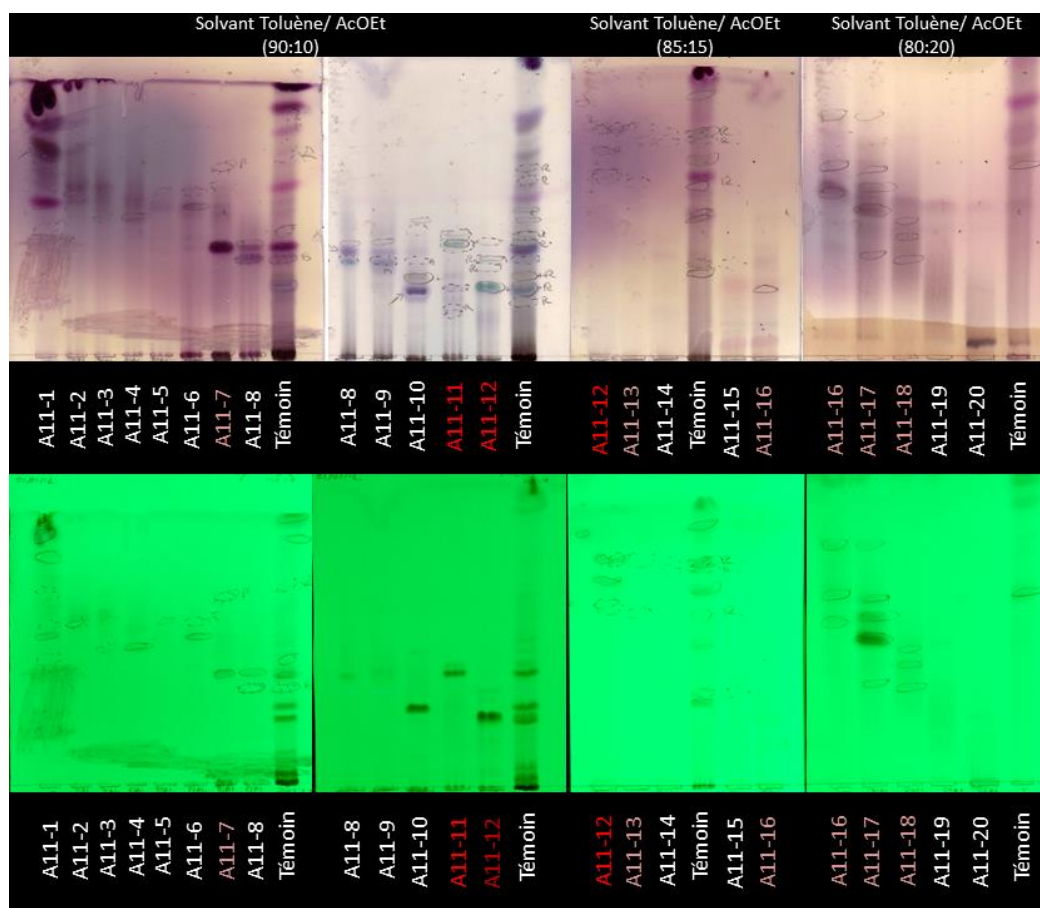
Les fractions colorées représentent les fractions les plus actives.

Les fractions en rouge foncé sont les plus sélectives.

La composition chimique des fractions a été contrôlée grâce à des CCM récapitulatives (**Figure 45**) et les fractions collectées ont été testées pour leur activité leishmanicide sur un autre modèle de leishmanie nouvellement disponible au laboratoire : *L. infantum*. Ce parasite est responsable de la leishmaniose viscérale humaine, potentiellement létale. Parallèlement, la cytotoxicité des fractions a été évaluée sur cellules saines de type VERO afin de déterminer les indices de sélectivité, ce qui n'avait pas pu être réalisé pour les extraits.

Le **Tableau 10** résume les résultats obtenus. Les fractions les plus actives ont été reportées en rouge dans le **Tableau 10** et sur le schéma de fractionnement (**Figure 44**). Les fractions représentées en rouge sombre sont celles qui présentent une très bonne activité leishmanicide associée à une haute sélectivité vis-à-vis du parasite (indice de sélectivité élevé).





**Figure 45 :** CMM récapitulative des fractions issues de l'extrait éther de pétrole **A1**.  
Solvant de migration : Toluène/AcOEt (90:10, 85:5 et 80:20) révélation sous UV à 254 nm et à la vanilline sulfurique.

**Tableau 10 :** Activités leishmanicides des fractions issues de **A1** sur amastigotes axéniques de *L. infantum* (IC<sub>50</sub>) et leurs cytotoxicités sur la lignée VERO (CC<sub>50</sub>)

Fractions issues de A1	<i>L. infantum</i> * CI <sub>50</sub> (µg/mL)	Lignées VERO* CC <sub>50</sub> (µg/mL)	Index de sélectivité
A11-1	>100	>100	ND
A11-2	85	>>100	296
A11-3	ND	ND	ND
A11-4	60	>100	3,0
A11-5	ND	ND	ND
A11-6	ND	ND	ND
<b>A11-7</b>	<b>12,9</b>	<b>&gt;&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
A11-8	ND	ND	ND
A11-9	43	>>100	>100
A11-10	ND	ND	ND
<b>A11-11</b>	<b>4,5</b>	<b>&gt;100</b>	<b>23,7</b>
<b>A11-12</b>	<b>1,4</b>	<b>&gt;100</b>	<b>84,5</b>
A11-13	<b>12</b>	88	<b>7,2</b>
A11-14	ND	ND	ND
A11-15	ND	ND	ND
<b>A11-16</b>	<b>4,0</b>	<b>22,2</b>	<b>5,4</b>
<b>A11-17</b>	<b>1,5</b>	<b>9,0</b>	<b>5,8</b>
<b>A11-18</b>	<b>17,5</b>	<b>92</b>	<b>5,2</b>
A11-19	11,6	41	3,5
A11-20	77	>100	ND

\*Valeurs mesurées par spectrophotométrie. Indices de sélectivités = CC<sub>50</sub>/ CI<sub>50</sub>. Les valeurs supérieures à 100 n'ont pas été précisées, mais indiquées comme « > 100 » ou « >> 100 » (lorsqu'elles étaient supérieures ou très largement supérieures à 100, respectivement).

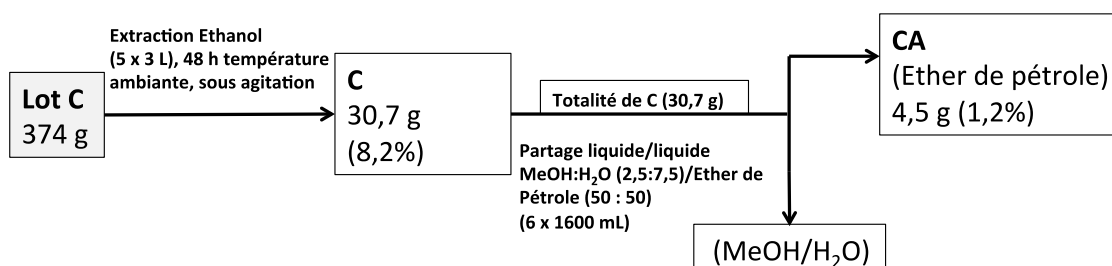
Les fractions les plus actives issues de l'extrait éther de pétrole (A11-11 à A11-18) ont été éluées avec un pourcentage d'AcOEt situé entre 10% et 50% (voir **Figure 44**). Ces fractions représentent près de 20% de la masse de résidu déposé.

Les résultats biologiques obtenus suite au fractionnement bioguidé de l'extrait **A1** nous ont ainsi permis de déterminer la zone de polarité, ainsi que le profil CCM des fractions concentrant l'activité. Il est apparu que les composés d'intérêt se situaient majoritairement dans la polarité intermédiaire de l'extrait éther de pétrole (10 à 50% AcOEt). Ils sont élués sur CCM avec un solvant de migration composé de toluène et d'acétate d'éthyle (80:20) ou d'un mélange CHCl<sub>3</sub>/MeOH (95:5). Ils sont révélés sous UV à 254 nm et prennent une coloration marron/grise après révélation à la vanilline sulfurique. Afin d'augmenter les rendements, il convient donc de développer une méthode d'extraction permettant de cibler cette zone avant le fractionnement.

## II. 2. Optimisation de l'extraction

### II. 2.1. Extraction du lot C

La mise au point de la méthode réalisée sur les **lots A et B** nous a permis d'améliorer le protocole d'extraction, afin de l'appliquer au **lot C**. Il est présenté à la **Figure 46**. Il a été décidé de réaliser une extraction par macération dans l'éthanol à 96°, conformément à la méthode utilisée pour les premiers extraits de criblage. Le **lot C** (374 g) a été extrait cinq fois par 3 L d'éthanol à 96° à température ambiante pendant 48 h pour donner 30,7 g d'extrait ethanologique C. La totalité du résidu a été soumise à un partage liquide/liquide entre un mélange hydro-méthanolique à 25% de MeOH et de l'éther de pétrole, dans des proportions équivalentes. La phase éther de pétrole a permis de récupérer les composés les plus apolaires de l'extrait, contenant les molécules actives.



**Figure 46** : Protocole d'extraction du **lot C**

### II. 2.2. Extraction du lot D

Le protocole d'extraction du **lot D** est un protocole amélioré de celui utilisé pour le **lot C**. Il est présenté à la **Figure 47**. Les molécules d'intérêt sont ciblées par des partages liquide/liquide successifs destinés à réduire les étapes de fractionnement en phase stationnaire solide et d'améliorer les rendements.

Cinq cent grammes du **lot D** ont été extraits trois fois par 5 L d'éthanol à 96° à température ambiante pendant 48 h pour donner 61,6 g d'extrait ethanologique D. La totalité du résidu a été soumise à un partage liquide/liquide entre un mélange hydro-méthanolique à 25% de MeOH et du dichlorométhane, dans des proportions équivalentes. La phase inférieure a été évaporée pour donner un résidu D1 (22,9 g) contenant les molécules apolaires de l'extrait. Afin d'éliminer les molécules les plus lipophiles de cette fraction dichlorométhane, l'intégralité du résidu D1 (22,9 g) a été soumise à un nouveau partage liquide/liquide entre du MeOH 100% et de l'heptane, en proportions équivalente. La fraction méthanolique obtenue D4 (13,2 g) contient les molécules d'intérêt.

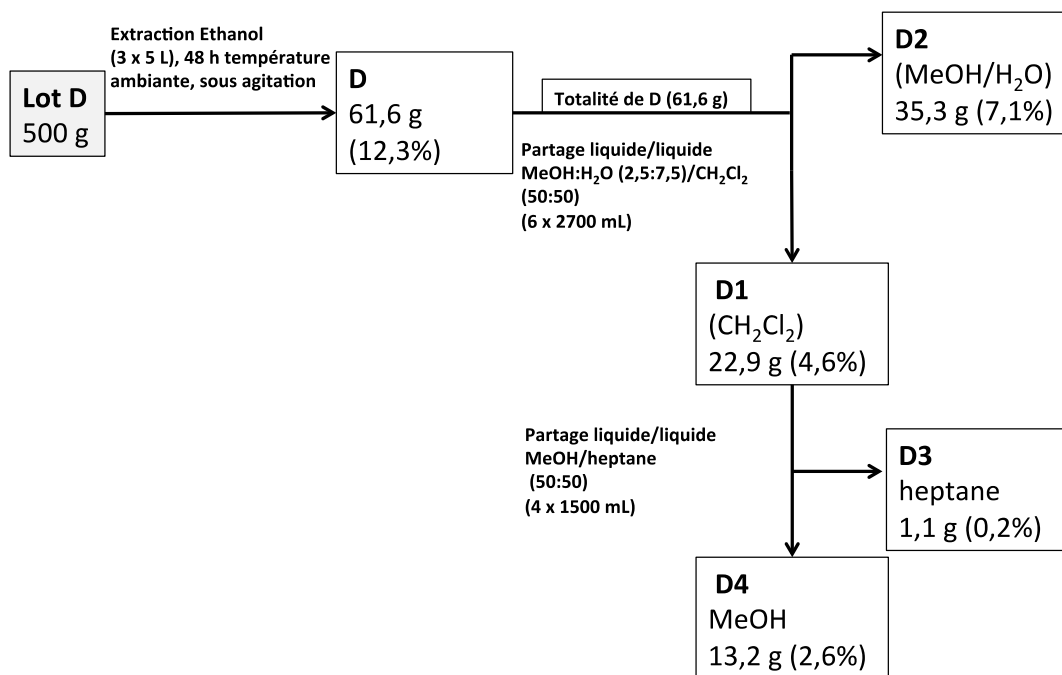


Figure 47 : Protocole d'extraction du lot D

## II. 2.3. Extraction du lot E

Nous avons souhaité rechercher la présence de lactones sesquiterpéniques au sein de l'extrait aqueux préparé à partir des parties aériennes de *P. spiralis*. Cette extraction a été réalisée sur le **lot E** et est représentée à la **Figure 48**. Une partie du **lot E** (353 g) a été extraite par infusion pendant 20 min, congelée puis lyophilisée afin de donner un résidu aqueux E (27,0 g). La totalité du résidu a été reprise dans de l'eau et soumise à un partage liquide/liquide entre de l'eau et du dichlorométhane afin de récupérer les molécules les plus apolaires dans la phase  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (EA, 620 mg). Une CCM de la phase dichlorométhane (**Figure 49**) confirme la présence des molécules recherchées au sein de cette phase, détectables sous UV à 254 nm et après révélation à la vanilline sulfurique sous forme de taches marrons/grises.

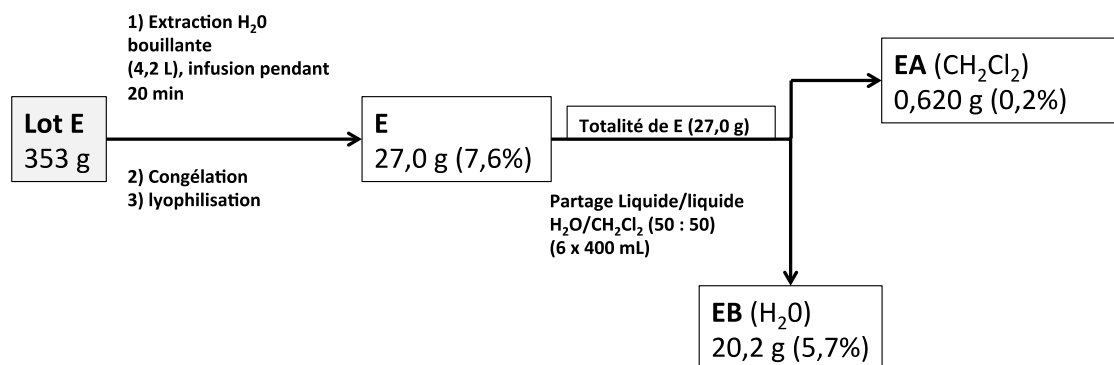
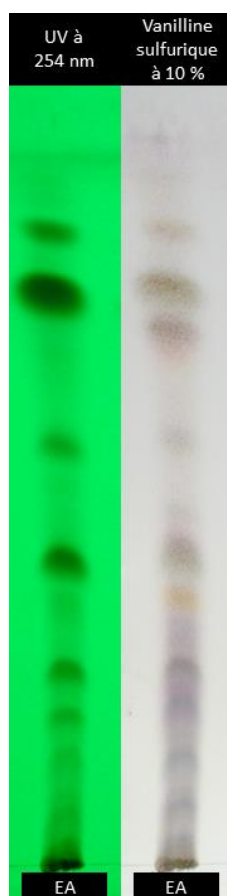


Figure 48 : Protocole d'extraction du lot E



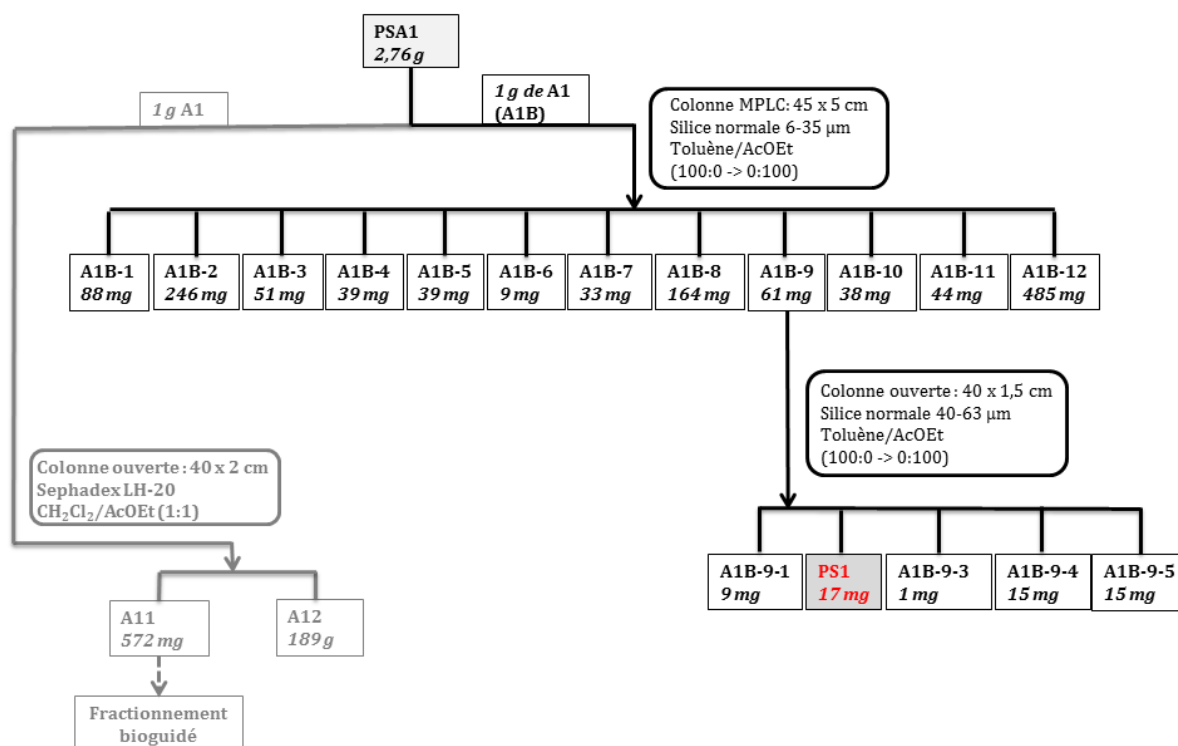
**Figure 49** : CCM de la phase  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  issue du partage liquide/liquide de l'extrait aqueux du **lot E** entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ .

Les composés d'intérêt sont révélés sous UV à 254 nm (à gauche) et à la vanilline sulfurique sous forme de taches marron/gris (à droite).  
Solvant de migration :  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (98:2, V/V)

## II. 3. Purification des composés

### II. 3.1. Purification du composé PS1 à partir de A1

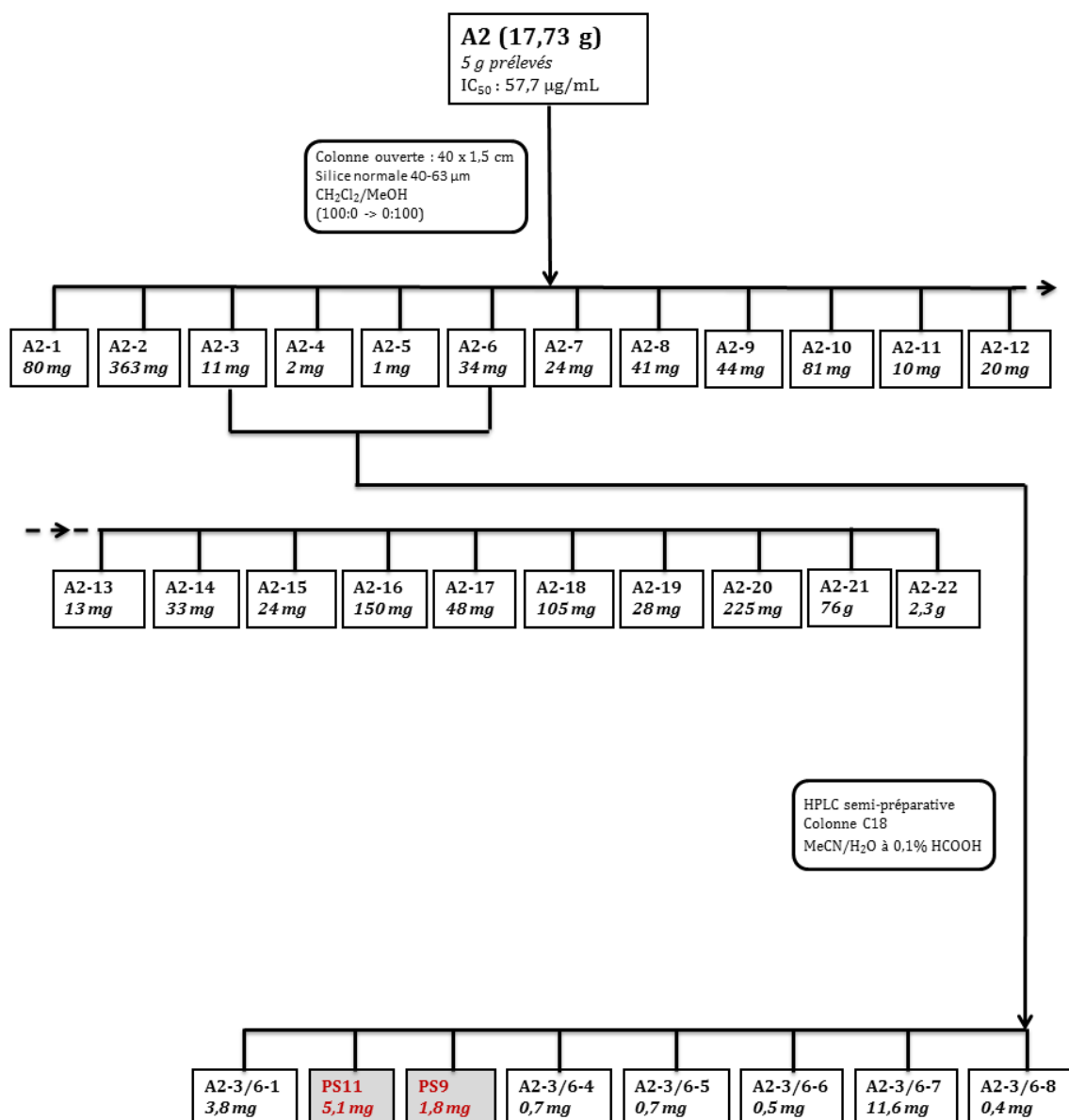
Une partie de l'extrait éther de pétrole A1 (1 g) a été séparée sur une colonne MPLC conditionnée avec de la silice normale. La séparation a conduit à 12 fractions identifiées A1B-1 à A1B-12 (voir **Figure 50**). La fraction A1B-9 (61 mg) a été chromatographiée sur colonne ouverte conditionnée avec de la silice normale. La deuxième fraction contenait 17 mg du composé **PS1** pur.



**Figure 50** : Schéma de purification du composé **PS1** à partir de 1 g de l'extract éther de pétrole **A1** (2,76 g).

## II. 3.2. Purification des composés **PS9** et **PS11** à partir de **A2**

Une partie de l'extract éthanolique **A2** (5 g) a été séparée sur une colonne ouverte conditionnée avec de la silice normale pour conduire à 22 fractions identifiées **A2-1** à **A2-22**. Les fractions **A2-3** (11 mg, 0,5% MeOH) et **A2-6** (34 mg, 1,5% MeOH) ont été séparées par HPLC préparative. Cette séparation a conduit à l'obtention des composés **PS11** (5,1 mg, Tr=12,0 min, 70% MeCN) et **PS9** (1,8 mg, Tr= 13,4 min, 75% MeCN). Le schéma de fractionnement est présenté en **Figure 51**.



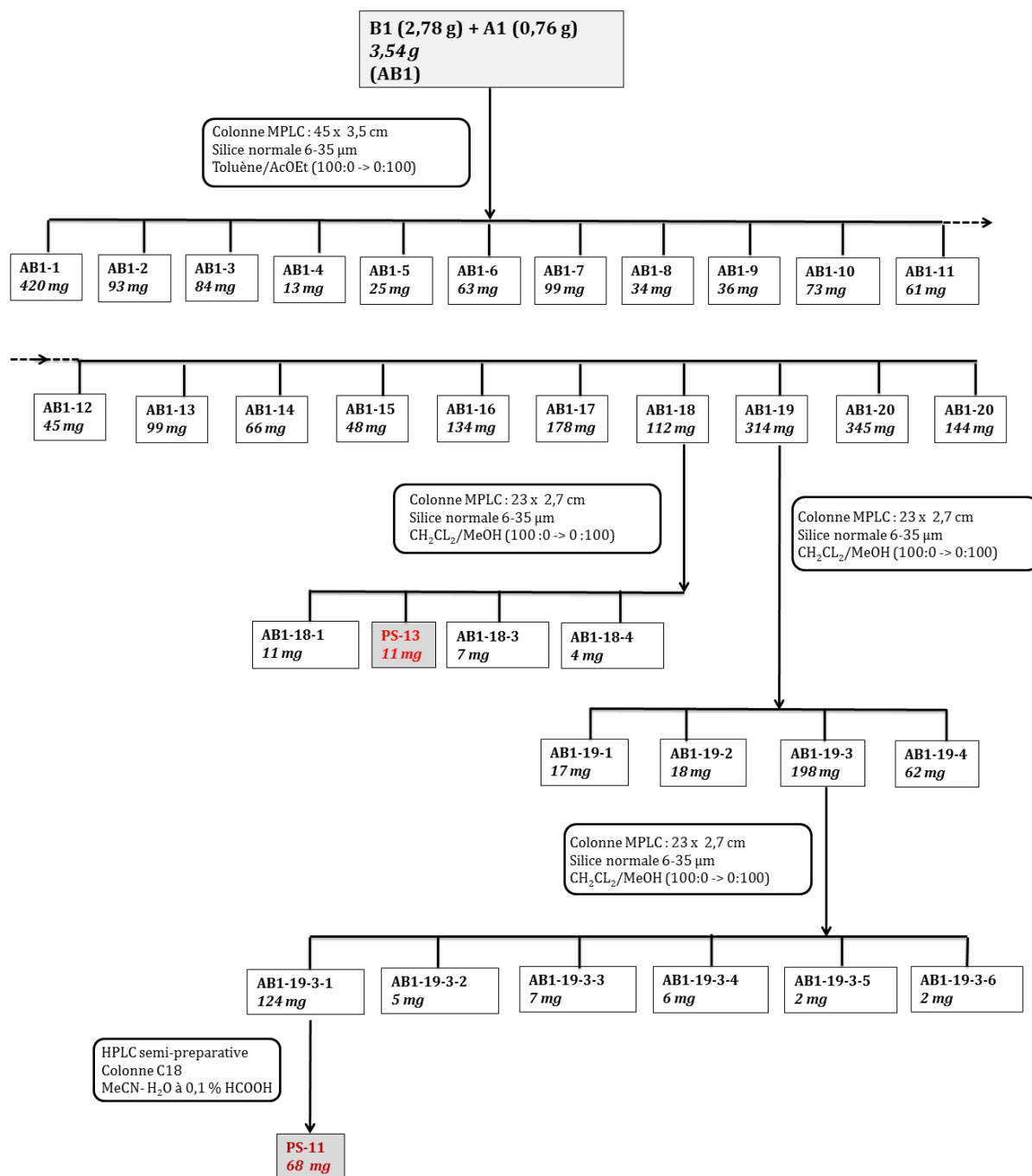
**Figure 51 :** Schéma de purification des composés **PS9** et **PS11**, à partir de 5 g de l'extrait éthanolique A2 (17,73 g).

### II. 3.3. Purification des composés **PS11** et **PS13** à partir de la réunion de A1 et B1

La totalité de l'extrait éther de pétrole B1 (2,78 g) et la part d'échantillon A1 n'ayant pas encore été séparée correspondant à 0,76 g ont été réunies en une même fraction (AB1, 3,54 g) dont le schéma de fractionnement est décrit en **Figure 52**.

Les 3,54 g de résidus provenant de cette réunion ont été séparés sur colonne MPLC conditionnée avec de la silice normale. La séparation a donné lieu à 20 fractions (AB1-1 à AB1-20). La fraction 18 (AB1-18, 112 mg) a été chromatographiée grâce à une colonne MPLC pour conduire à 4 fractions (AB1-18-1 à AB1-18-4). La seconde fraction contenait 11 mg du composé **PS13**. La fraction 19 (AB1-19, 314 mg), issue de la première colonne, a été fractionnée dans les mêmes conditions de colonne et de solvant pour donner 4 fractions (AB1-19-1 à AB1-19-4). La troisième fraction (AB1-19-3, 198 mg) a été séparée de nouveau dans les mêmes conditions pour donner 6 fractions (AB1-19-3-1 à AB1-19-3-6). La première d'entre elles (AB1-19-3-1, 124 mg) a été purifiée de nouveau par HPLC préparative pour conduire à l'isolement du composé **PS11** (68 mg, Tr= 12,0 min, 50% MeCN).

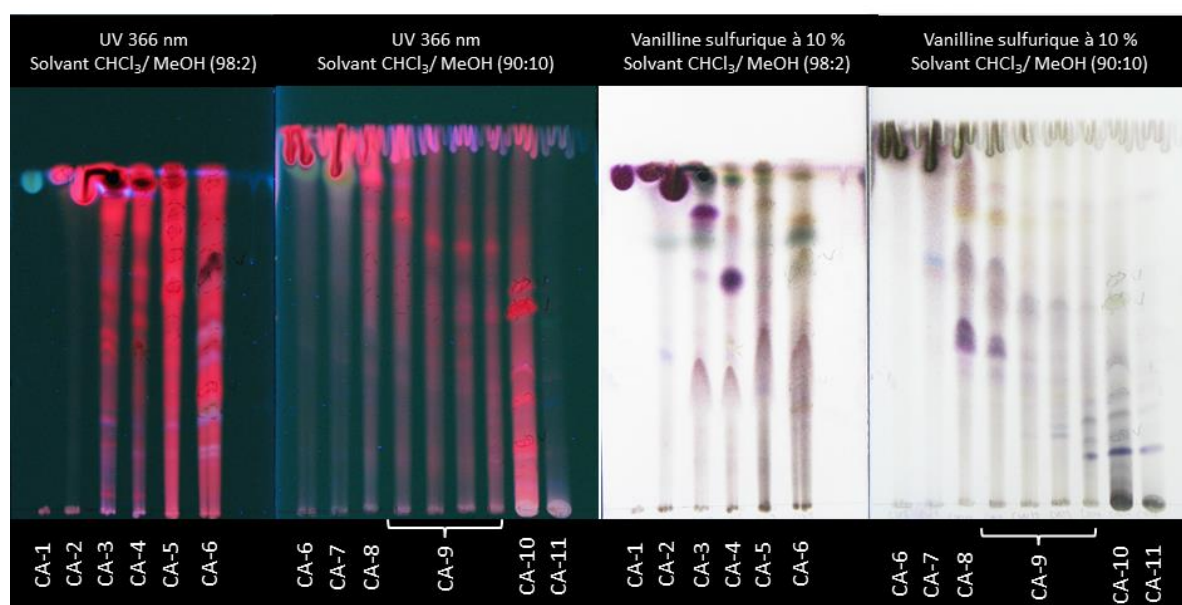




**Figure 52 :** Schéma de purification des composés **PS11** et **PS13**, à partir de la réunion de l'extrait éther de pétrole B1 (2,78 g) et des 0,76 g restants de l'extrait éther de pétrole A1.

## II. 3.4. Purification des composés PS9, PS13, PS14, PS15, PS16 et PS17 à partir de CA

La totalité de la phase éther de pétrole CA (4,52 g) obtenue à partir de l'extrait éthanolique du **lot C** a été fractionnée sur une colonne ouverte conditionnée avec de la silice normale. Ce fractionnement est détaillé à la **Figure 54** et a conduit à 11 fractions (CA-1 à CA-11) comme présenté à la **Figure 53**.



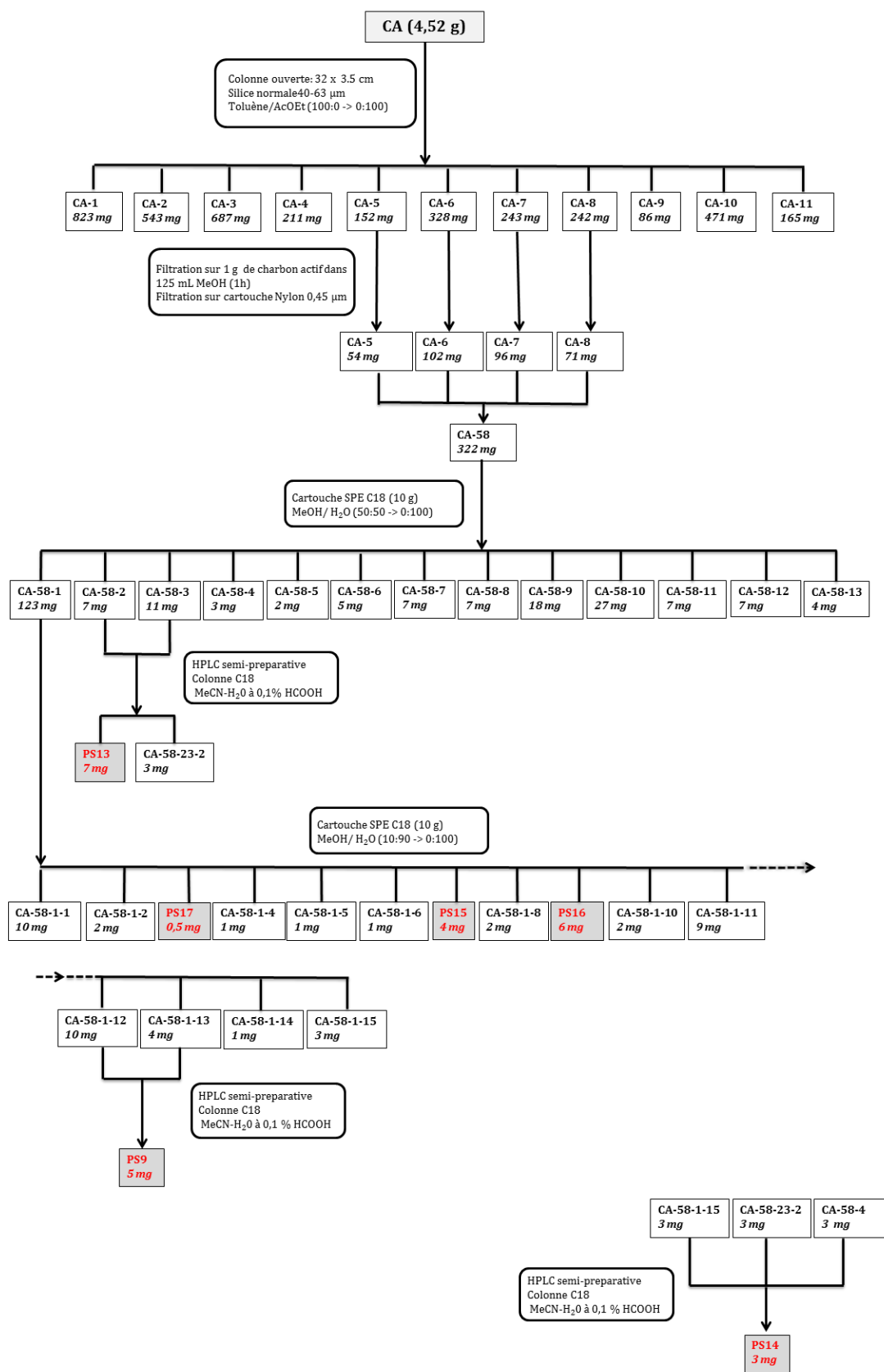
**Figure 53** : CCM récapitulative des fractions CA-1 à CA-11 avant leur filtration sur charbon actif.

Solvant de migration :  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (98:2 et 90:10),  
révélation sous UV à 366 nm et à la vanilline sulfurique à 10%.

Les fractions 5 à 8 (CA-5 à CA-8) contenant les molécules d'intérêt d'après leurs profils CCM, ont été filtrées sur charbon actif, puis réunies afin de constituer une seule fraction enrichie en lactones sesquiterpéniques CA-58 (322 mg). Cette dernière fraction a été séparée sur C18 pour donner 13 fractions (CA-58-1 à CA-58-13).

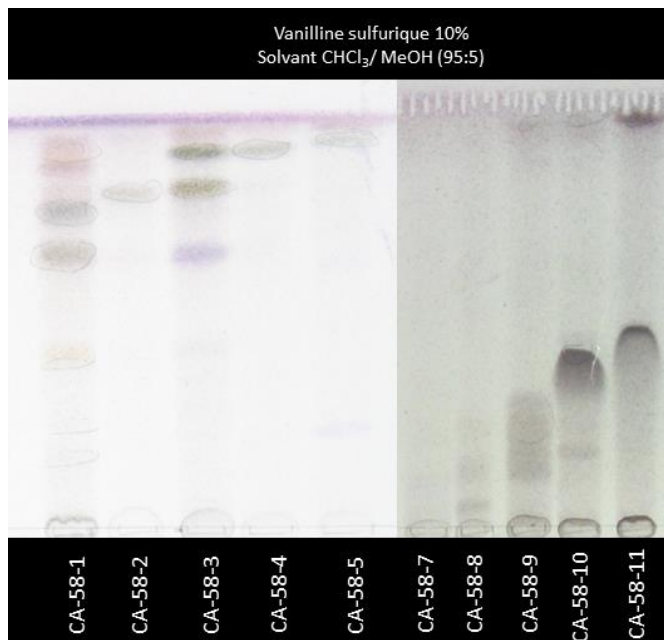
Les fractions CA-58-2 (7 mg) et CA-58-3 (11 mg) ont été réunies (CA-58-23, 18 mg) et séparées par HPLC préparative pour donner le composé **PS13** (7 mg,  $T_r = 20,4$  min, 55% MeCN) et une fraction contenant **PS14** en mélange (CA-58-23-2, 3 mg).

La fraction CA-58-1 a été fractionnée de nouveau sur C18 pour conduire à 15 fractions (CA-58-1-1 à CA-58-1-15). La 3<sup>ème</sup> fraction a été identifiée comme le composé **PS17** (0,5 mg), la fraction 7 comme le composé **PS15** (4 mg) et la fraction 9 comme le composé **PS16** (6 mg). Les 12<sup>ème</sup> et 13<sup>ème</sup> fractions (CA-58-1-12, 10 mg et CA-58-1-13, 4 mg) ont été réunies et séparées par HPLC préparative pour donner **PS9** (5 mg,  $T_r = 9,9$  min, 50% MeCN).



**Figure 54 :** Schéma de purification des composés PS9, PS13, PS14, PS15, PS16 et PS17 à partir de la phase éther de pétrole CA (4,52 g).

La fraction 15 (CA-58-1-15, 3 mg) et les fractions précédentes CA-58-23-2 (3 mg) et CA-58-4 (3 mg) présentant des profils CCM proches ont été réunies puis séparées par HPLC préparative afin de donner le composé **PS14** (3 mg, Tr= 12,5 min, 60% MeCN).



**Figure 55** : CCM récapitulative des fractions CA-58-1 à CA-58-11.

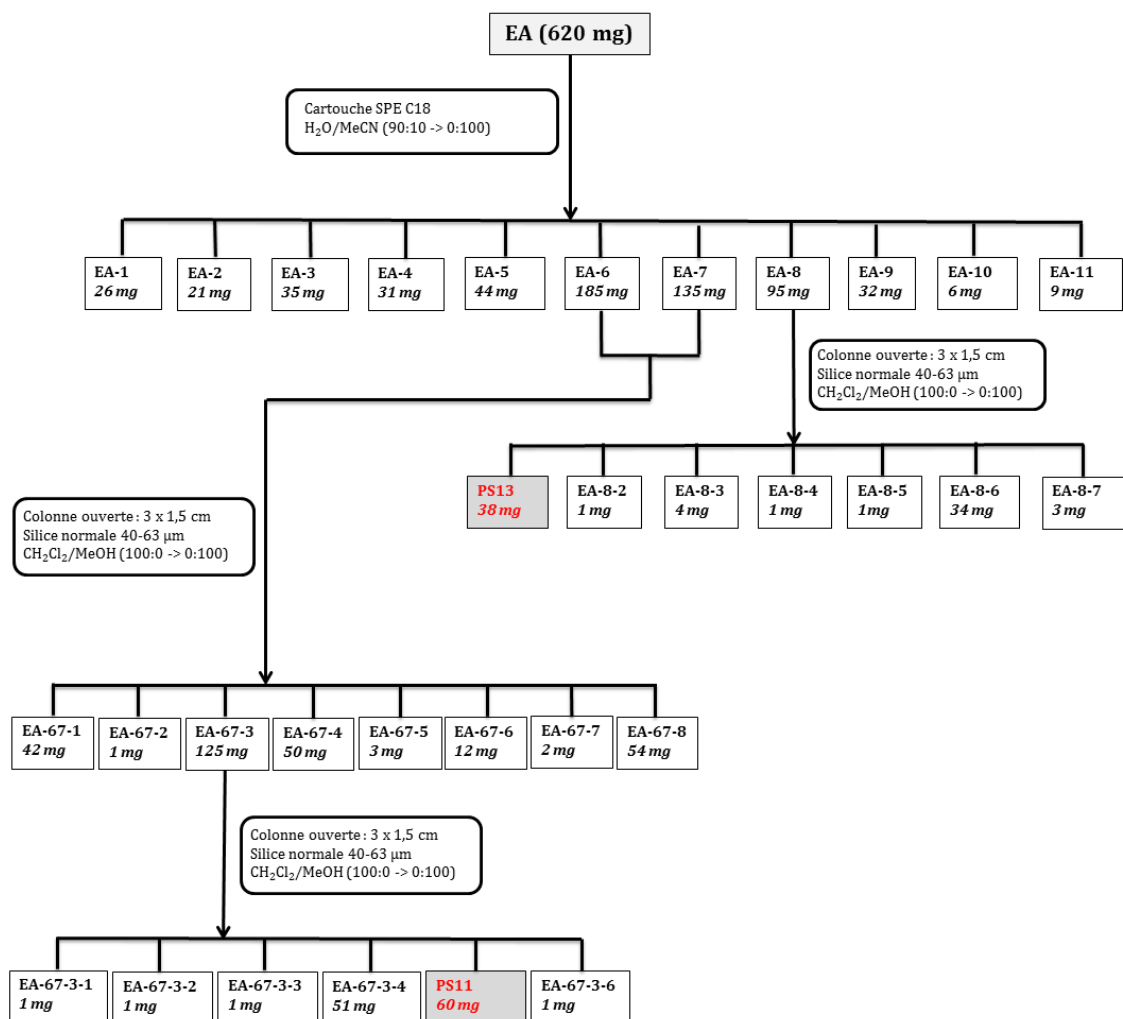
Solvant de migration :  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (95:5), révélation à la vanilline sulfurique. Les premières fractions CA-58-1 à CA-58-5 contiennent des lactones sesquiterpéniques. Les fractions CA-58-7 à CA-58-11 contiennent des composés coéluant avec les STLs sur silice normale.

Notons que dans ce schéma de purification, l'étape de filtration sur charbon actif élimine les chlorophylles et autres pigments, et permet d'améliorer ainsi la détection des STLs sur CCM. Cette filtration élimine également des impuretés coéluant avec les STLs sur silice, et améliore ainsi la résolution des CCM. Cette élimination est parachevée lors de l'étape suivante de chromatographie sur silice C-18 (**Figure 55**).

## II. 3.5. Purification des composés PS11 et PS13 à partir du lot E

La phase chloroformique EA (620 mg) de l'extrait aqueux préparé à partir du **lot E** a été fractionnée sur C18 pour donner 11 fractions (EA-1 à EA-11) comme indiqué à la **Figure 56**. La fraction EA-8 (95 mg) a été séparée sur colonne conditionnée avec de la silice normale. La séparation a donné 7 fractions (EA-8-1 à EA-8-7), la première fraction ayant été identifiée comme étant le composé **PS13** (38 mg).

Les fractions EA-6 (185 mg) et EA-7 (135 mg) ont été réunies et séparées sur une colonne ouverte conditionnée avec de la silice normale pour donner 8 fractions (EA-67-1 à EA-67-8). La troisième fraction (EA-67-3, 125 mg) a été séparée dans les mêmes conditions pour donner 6 fractions (EA-67-3-1 à EA-67-3-6). La 5<sup>ème</sup> fraction a été identifiée comme étant le composé **PS11** (60 mg).



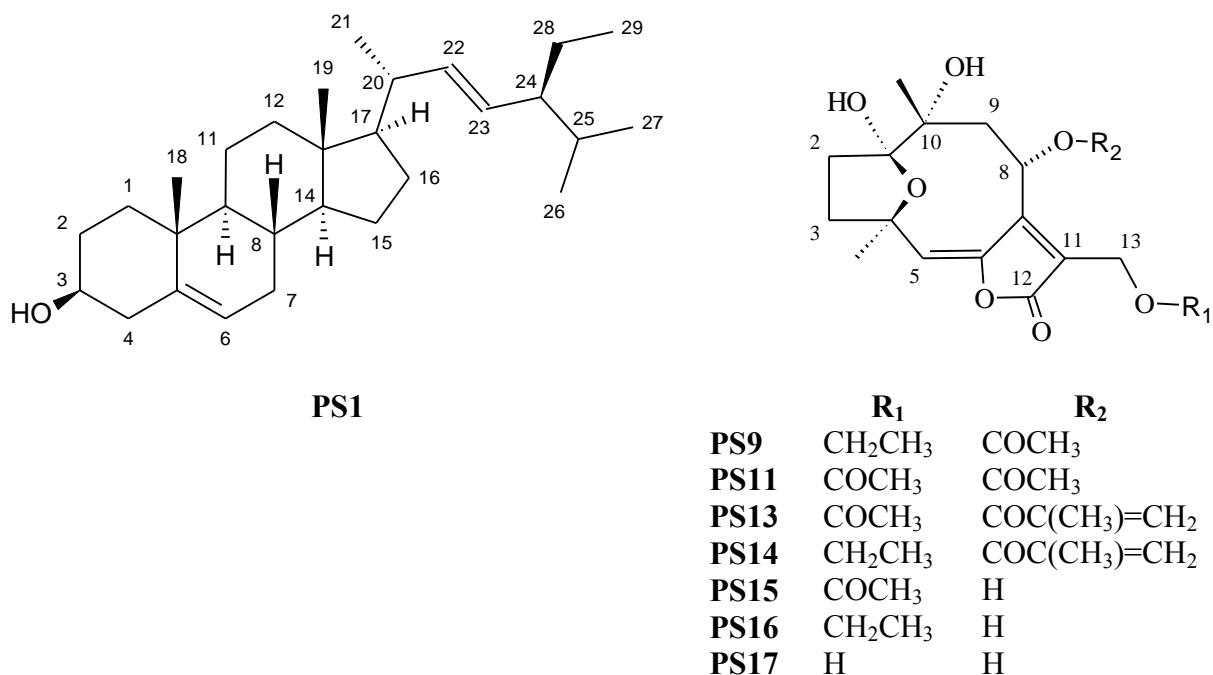
**Figure 56** : Schéma de purification des composés **PS11** et **PS13**, à partir de la phase chloroformique EA de l'extrait aqueux (620 mg) du lot E.

## II. 4. Bilan de fractionnement et molécules isolées

L'étude phytochimique des parties aériennes de *P. spiralis* a conduit à l'isolement de 8 composés connus.

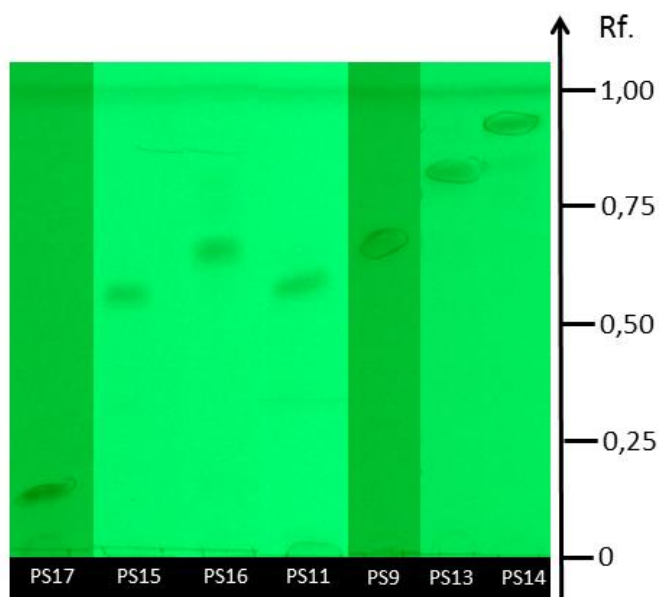
Le composé **PS1** a été identifié comme étant le  $\beta$ -stigmastérol, un phytostérol commun. Les 7 autres composés, **PS9**, **PS11**, **PS13**, **PS14**, **PS15**, **PS16** et **PS17**, sont des lactones sesquiterpéniques, présentant toutes le même noyau structural de type hirsutinolide. Ces dernières ont été identifiées comme étant le 8-acétyl-13-éthoxypiptocarphol (**PS9**), le diacétylpiptocarphol (**PS11**), les piptocarphines A (**PS13**), F (**PS14**) et D (**PS15**), le (1*S*\*,4*R*\*,8*S*\*,10*R*\*)-1,4-époxy-13-éthoxy-1,8,10-trihydroxygermacra-5*E*,7(11)-dièn-6,12-olide (**PS16**), et le piptocarphol (**PS17**).

Les structures des composés isolés sont présentées à la **Figure 57** et leur détermination structurale est détaillée au chapitre III.



**Figure 57** : Structures des composés isolés de *P. spiralis*

Les hirsutinolides isolés sont élués en CCM en présence d'un solvant composé d'un mélange CHCl<sub>3</sub>/MeOH (95:5). Ils sont révélés sous UV à 254 nm et à la vanilline sulfurique sous la forme de tâches de coloration marron/grise (**Figure 58**).



**Figure 58** : CCM récapitulative des hirsutinolides isolés.

Solvant de migration :  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (95:5), révélation sous UV à 254 nm.

Certaines de ces molécules ont été isolées à plusieurs reprises à partir d'extraits et de fractions différentes. Les « réisolements » des composés ont été nécessaires pour plusieurs raisons. La première est d'obtenir des quantités suffisantes de composés permettant de réaliser l'ensemble des analyses d'identification et les tests biologiques. La seconde raison est qu'il est apparu que certaines de ces lactones sesquiterpéniques se sont dégradées au cours du temps, comme cela a déjà été souligné dans la littérature (Catalán *et al.*, 1986 ; Pollora *et al.*, 2000). Pour ce qui nous concerne, cette dégradation est probablement due aux nombreux changements de solvants et aux variations de température qu'ils ont subi au cours de leurs analyses spectrales. Ces étapes ont été nécessaires à la réalisation des analyses de RMN, du fait de la difficulté d'obtenir des spectres résolus. Il a par ailleurs déjà été souligné dans la littérature que le  $\text{CDCl}_3$ , légèrement acide, semblait participer à la dégradation de certains hirsutinolides (Kos *et al.*, 2006).

Finalement, le **Tableau 11** récapitule la provenance ainsi que les activités biologiques des composés qui ont pu être testés. Les résultats biologiques seront discutés plus en détail au chapitre VI.

Il apparaît que les meilleurs rendements ont été obtenus, pour les composés **PS11** et **PS13**, à partir de l'extrait aqueux. Cette méthode d'extraction semble donc à privilégier pour l'isolement de lactones sesquiterpéniques de type hirsutinolide, même si la composition quantitative des extraits restent à vérifier par des méthodes de dosage.

**Tableau 11** : Tableau récapitulatif des composés isolés des parties aériennes de *P. spiralis*

Comp.	Extraits	Lots	Phases	Rendements (mg pour 100 g de plante sèche)	CI <sub>50</sub> (μM) <i>P. falciparum</i> *	CC <sub>50</sub> (μM) VERO **	CI <sub>50</sub> (μM) promastigotes <i>L.</i> <i>infantum</i> ***	CI <sub>50</sub> (μM) amastigotes axéniques <i>L.</i> <i>infantum</i> ***	CC <sub>50</sub> (μM) Macrophages **
PS1	EP	A	A1	19,9	ND	ND	ND	ND	ND
PS9	EtOH	A	A2	2,7	ND	ND	ND	ND	ND
	EtOH	C	CA	1,3					
PS11	EtOH	A	A2	7,6	7,8 ± 1,2	3,7 ± 1,5	24,1 ± 4,5	4,7 ± 1,8	1,4 ± 0,08
	EP	A+B	A1+B1	15,1					
	H <sub>2</sub> O	E	EA	17,0					
PS13	EP	A+B	A1+B1	2,5	6,9 ± 0,9	1,8 ± 0,07	9,5 ± 0,2	2,0 ± 1,4	0,9 ± 0,07
	H <sub>2</sub> O	E	EA	10,8					
	EtOH	C	CA	1,9					
PS14	EtOH	C	CA	0,8	ND	ND	ND	ND	ND
PS15	EtOH	C	CA	1,1	50 (n=1)	17,6 ± 8,0	86,3 ± 13	17,0 ± 0,6	5,5 ± 1,9
PS16	EtOH	C	CA	1,6	54,9 ± 3,4	75,2 ± 37	31,5 ± 3	5,4 ± 4,4	3,1 ± 1,0
PS17	EtOH	C	CA	0,1	Non stable	90 ± 40	> 100	68 ± 14	ND
Chloroquine	-				549,2 ± 68 nM	-	-	-	-
Artémisinine	-				13,9 ± 7,7 nM	-	-	-	-
Ampho. B					-	-	0,03 ± 0,01	0,34 ± 0,2	2,5 ± 0,2

\*L'activité antipaludique a été évaluée sur une souche de *P. falciparum* FcM29 résistante à la chloroquine, par mesure de la radioactivité après incorporation d'hypoxanthine tritiée. \*\*La cytotoxicité sur cellules VERO et macrophages murins a été évaluée par spectrophotométrie (voir matériel et méthode) \*\*\*L'activité leishmanicide a été évaluée *in vitro* sur *L. infantum* aux stades promastigote et amastigote axénique, par mesure de l'activité luciférase. EP: éther de pétrole ; ND: non déterminé.



### III. Identification des hirsutinolides isolés

#### III. 1. Détermination structurale de PS9

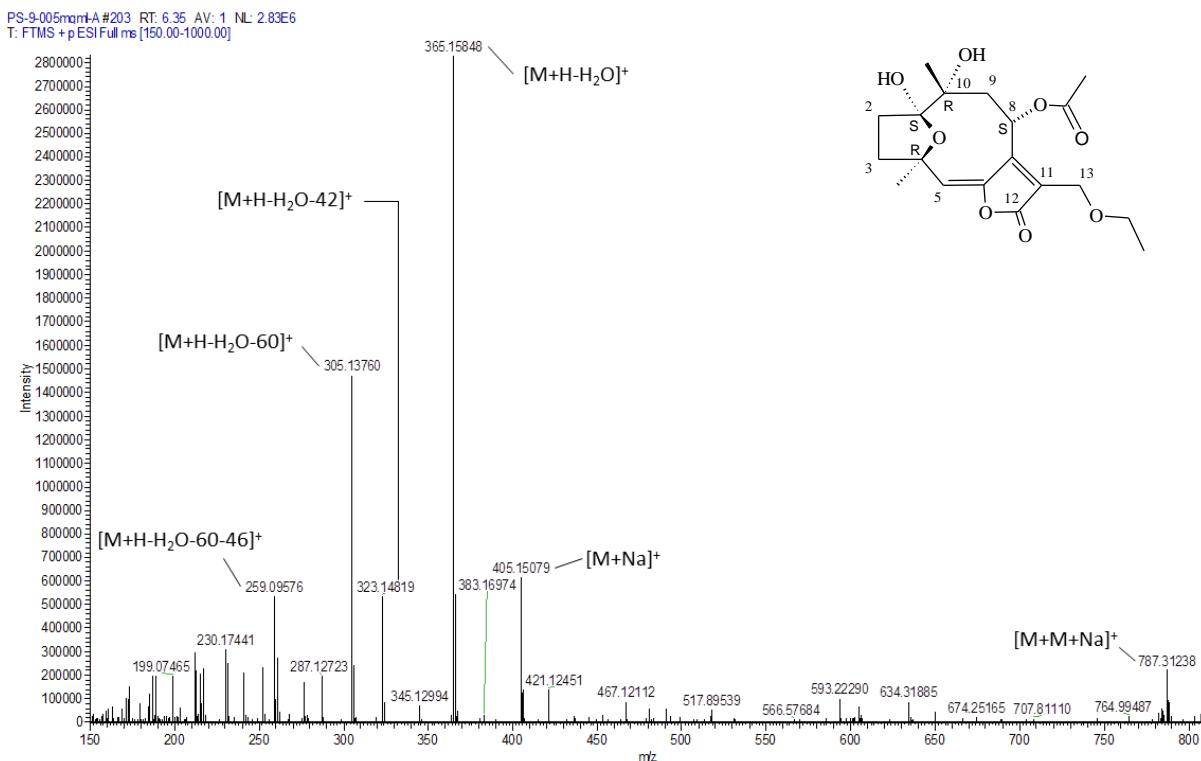
Le composé **PS9** a été isolé sous forme d'une huile jaune pâle. En CCM, **PS9** possède un rapport frontal de 0,68 lorsque la plaque CCM est éluée avec un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (95:5) comme solvant de migration. Le composé est révélé sous UV à 254 nm et apparaît sous la forme d'une tache marron/grise après révélation à la vanilline sulfurique.

##### III. 1.1. Spectroscopie de masse

Le spectre de masse obtenu en mode ESI positif (**Figure 59**) présente un ion de  $m/z$  405 et un ion majoritaire de  $m/z$  365 correspondant respectivement à l'adduit sodé  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  et à l'ion  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ . Ces informations permettent de proposer pour le composé **PS9** une masse atomique de 382 uma.

Trois ions fils majoritaires sont présents de  $m/z$  323,  $m/z$  305 et  $m/z$  259. L'ion de  $m/z$  305 provient le plus probablement de la perte d'un groupement acétyle sur l'ion majoritaire donnant  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-60]^+$ . Cette hypothèse semble être confirmée par la perte de neutre de 42 uma à partir ce même ion, correspondant au départ d'un groupement cétène  $\text{O}=\text{C}=\text{CH}_2$ . Cette perte donne lieu à l'ion fils de  $m/z$  323. Enfin l'ion présent à  $m/z$  259 provient le plus vraisemblablement des pertes successives du groupement acétyle et d'un groupe partant de 46 uma, pouvant correspondre à un groupement éthanol.

Le spectre de masse haute résolution obtenu permet de suggérer la formule brute  $[\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_8+\text{Na}]^+$  calculée pour l'adduit sodium à  $m/z$  405,15079, la masse calculée pour  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{Na}$  étant de 405,15199 uma. Le degré d'insaturation de la molécule est donc de 7. Le noyau hirsutinolide présente 6 insaturations, la 7<sup>ème</sup> insaturation est en accord avec l'hypothèse d'un substituant de nature acétyle.

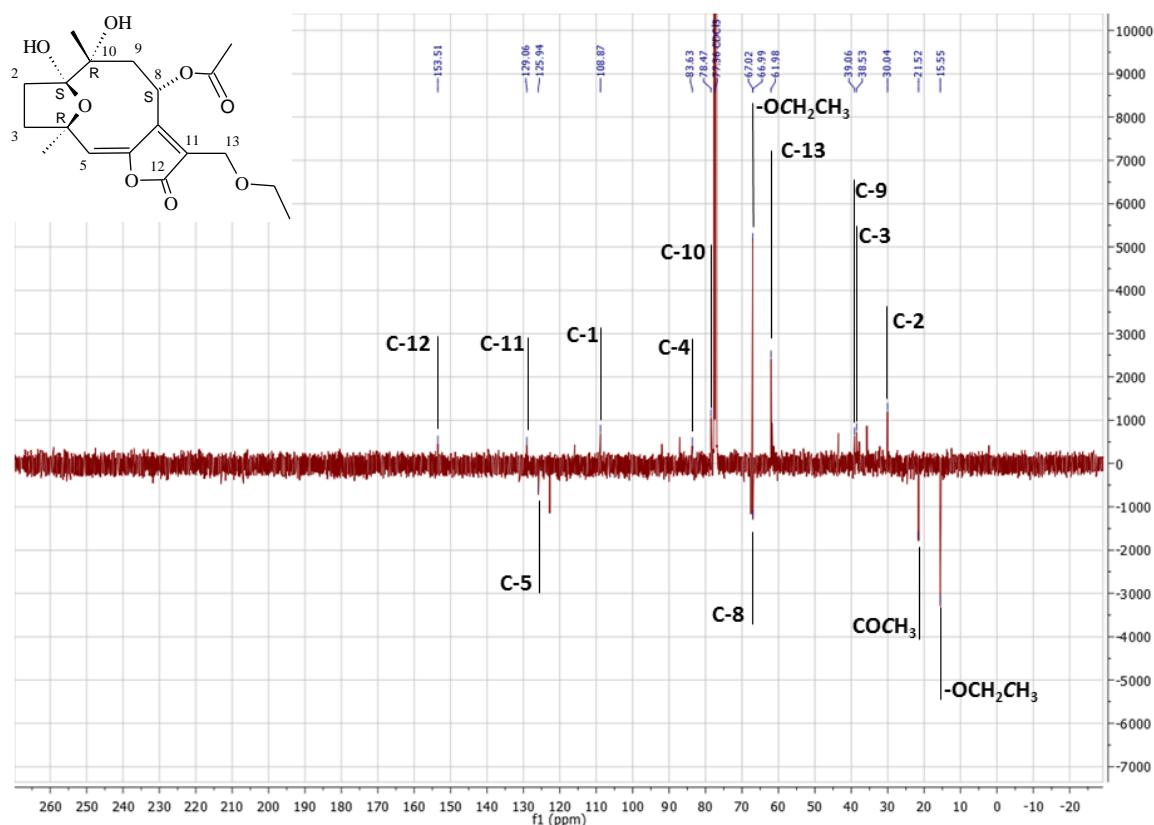


**Figure 59** : Spectre de masse du composé **PS9** obtenu en mode ESI positif

### III. 1.2. Spectroscopie RMN

Le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  (**Figure 60**) enregistré en *J-modulé* dans le  $\text{CDCl}_3$  indique la présence de 14 atomes de carbone seulement sur les 19 attendus, dont 5 carbones quaternaires, 2 groupements CH, 5 méthylènes et 2 méthyles. Les signaux des carbones C-14 et C-15 ne relaxent pas. Les carbones quaternaires C-6, C-7 ne sont pas visibles, de même que le carbone quaternaire du groupement acétyle.

Généralement, il est à remarquer que peu de signaux  $^{13}\text{C}$  du noyau hirsutinolide apparaissent lors des analyses de RMN  $^{13}\text{C}$  réalisées en *J-modulé* dans le  $\text{CDCl}_3$ . Finalement, on note le plus souvent pour ces composés la présence d'un signal  $\text{CH}_2$  à un déplacement chimique compris entre  $\delta_{\text{C}}$  54,9 et 62,0 ppm appartenant au carbone méthylénique C-13 et un signal CH à un déplacement chimique compris entre  $\delta_{\text{C}}$  63,9 et 66,7 ppm correspondant à C-8.



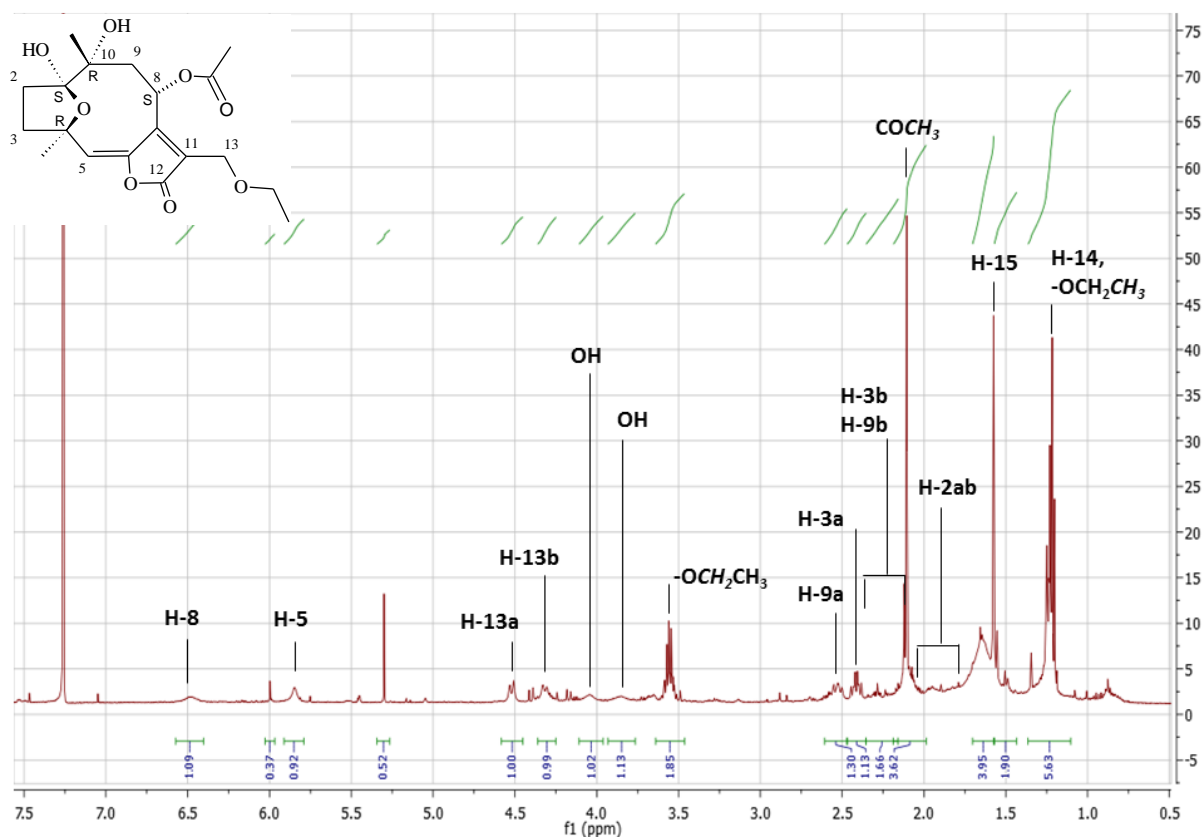
**Figure 60 :** Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  en *J*-modulé du composé **PS9** (298 K, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Le spectre  $^1\text{H}$  du composé **PS9** est présenté à la **Figure 61**. L'ensemble des signaux propres au noyau hirsutinolide est présent. Pour **PS9** et pour tous les hirsutinolides isolés dans ce travail, il est observé dans le  $\text{CDCl}_3$  :

- Deux singulets d'intensité 3H à  $\delta_{\text{H}}$  compris entre 1,21 et 1,26 ppm et  $\delta_{\text{H}}$  compris entre 1,57 et 1,67 ppm correspondant aux groupements méthyles H-14 et H-15, respectivement.
- La présence d'un singulet d'intensité 1H à un déplacement chimique  $\delta_{\text{H}}$  compris entre 5,83 et 5,94 ppm correspondant à l'hydrogène H-5.
- Le signal peu résolu de l'hydrogène H-8 d'intensité 1H, à un déplacement chimique  $\delta_{\text{H}}$  compris entre 6,44 et 6,64 ppm pour les composés estérifiés en position 8.
- Deux signaux larges à  $\delta_{\text{H}} \sim 3,80$  et  $4,09$  ppm, correspondant aux hydrogènes non échangeables des deux fonctions hydroxyles portées par les carbones C-1 et C-10.
- Les signaux des hydrogènes méthyléniques diastéréotopiques H-2a/b à des déplacements chimiques compris entre  $\delta_{\text{H}} \sim 1,77$  ppm et  $\delta_{\text{H}} \sim 2,00$  ppm, sous forme de multiplets élargis, non résolus. Le signal de l'hydrogène H-2a est le plus déblindé, il est orienté en  $\alpha$  soit en *cis* par rapport à l'hydroxyle de la fonction hémicétal

(Cowall *et al.*, 1981).

- Les signaux des hydrogènes méthyléniques diastéréotopiques H-3a/b. Le signal de l'hydrogène H-3a apparaît à un déplacement chimique  $\delta_H \sim 2,40$  ppm sous la forme d'un multiplet plus ou moins résolu selon les composés. Le signal de l'hydrogène H-3b, quant à lui, apparaît sous la forme d'un multiplet à  $\delta_H$  compris entre 2,08 et 2,15 ppm, le plus souvent superposé au signal multiplet de l'hydrogène H-9b. Le déplacement chimique élevé de H-3a par rapport à H-3b pourrait être dû, comme dans le cas de H-2a, à son orientation *cis* par rapport à l'hydroxyle HO-1.
- Les signaux des hydrogènes méthyléniques diastéréotopiques H-9a/b. Le signal de l'hydrogène H-9a apparaît à des déplacements chimiques compris entre  $\delta_H$  2,50 ppm et  $\delta_H$  2,61 ppm, sous la forme d'un multiplet mal résolu ou bien d'un doublet de doublet avec pour constantes de couplage  $J_{H-9a/H-9b} \sim 16$  Hz et  $J_{H-9a/H-8}$  comprise entre 8,5 et 11 Hz. L'hydrogène H-9a étant plus déblindé que H-9b, il est plus proche spatialement de l'oxygène porté par la position 8, en dessous du plan du cycle, donc orienté  $\alpha$ .
- Les signaux des hydrogènes diastéréotopiques H-13a et H-13b. Le signal de l'hydrogène H-13a apparaît à un déplacement chimique compris entre  $\delta_H$  4,31 et 5,33 ppm et le signal de l'hydrogène H-13b à un déplacement chimique compris entre 4,31 et 4,96 ppm. Il s'agit généralement de deux doublets de constante de couplage géminale  $J_{H-13a/H-13b} \sim 13$  Hz.
- Enfin, certains signaux protons du noyau hirsutinolide apparaissent élargis, notamment les hydrogènes H-8 et H-5.



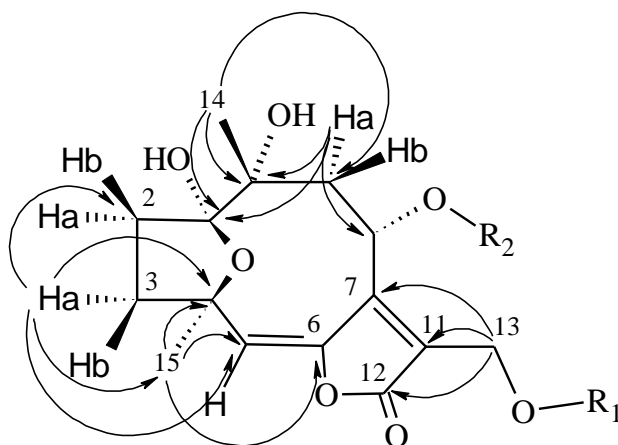
**Figure 61** : Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé **PS9** (298 K, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Concernant les signaux propres au composé **PS9**, on note :

- L'élargissement des signaux à  $\delta_{\text{H}}$  6,48 (H-8), 5,43 (H-5) et 1,60 ppm (H-15).
- Un singulet d'intensité 3H présent à un déplacement chimique  $\delta_{\text{H}}$  2,10 ppm, correspondant le plus probablement au groupement méthyle d'une fonction acétate.
- La présence d'un signal d'intensité 6H à 1,23 ppm correspondant à 2 groupements méthyles. Ce signal correspond aux signaux superposés du méthyle  $\text{CH}_3$ -14, un singulet, et du méthyle de la fonction  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ , apparaissant comme un triplet. Ces derniers couplent avec les deux hydrogènes méthyléniques voisins avec une constante de couplage  $J=6,8$  Hz.
- Un multiplet d'intensité 2H à  $\delta_{\text{H}}$  3,58 ppm correspondant bien au déplacement chimique attendu pour les hydrogènes méthyléniques de la fonction  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ . La multiplicité de ce signal devrait être un quadruplet de par l'unique couplage avec les hydrogènes méthyliques voisins. Ici, le signal apparaît comme un multiplet complexe dû, probablement, aux signaux « parasites » (voir plus loin).

Les corrélations observées en analyse de RMN 2D HSQC et HMBC (**Figure 62**) permettent l'attribution des déplacements chimiques des différents carbones. De manière générale, il est observé pour la structure générale du noyau hirsutinolide :

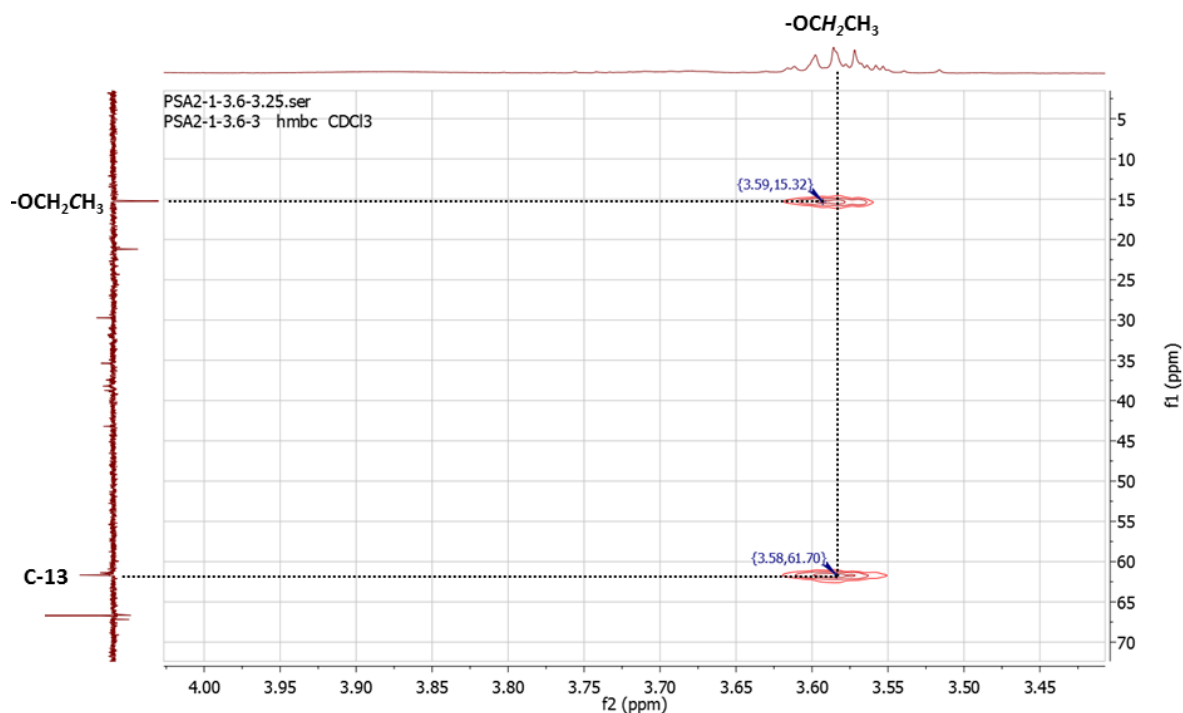
- La présence de 4 signaux de carbones quaternaires caractéristiques du cycle furanone aux déplacements chimiques suivants :  $\delta_C$  166-169 ppm (C-12),  $\delta_C$  127-131 ppm (C-11),  $\delta_C$  153-158 ppm (C-7),  $\delta_C$  143-149 ppm (C-6).
- Les corrélations observées en HMBC entre le système AB des hydrogènes H-13ab et les carbones C-7, C-11 et C-12, en accord avec un cycle  $\gamma$ -lactone  $\alpha,\beta$ -insaturé.
- 2 signaux méthyles à un déplacement chimique  $\delta_C$  compris entre 1,22 et 1,27 ppm pour C-14 et entre 1,57 et 1,67 ppm pour C-15. Ces méthyles sont respectivement en position C-10 ( $\delta_C = 77,5$ -78,7 ppm) pour le groupement méthyle CH<sub>3</sub>-14 et C-4 ( $\delta_C = 82,0$ -83,9 ppm) pour le groupement méthyle CH<sub>3</sub>-15 d'après les corrélations HMBC observées.
- La position déblindée des deux derniers carbones quaternaires C-1, à un déplacement chimique  $\delta_C$  compris entre 108,5 et 110,3 ppm, et C-4 ayant un déplacement chimique  $\delta_C$  compris entre 82,0 et 83,9 ppm, en accord avec la présence d'un pont éther-oxyde entre ces deux positions.
- La présence de 4 signaux méthyléniques à  $\delta_C$  54-62 ppm (C-13),  $\delta_C \sim 38$  ppm (C-9),  $\delta_C$  37-38 ppm (C-3) et  $\delta_C$  31-32 ppm (C-2).
- La corrélation observée en HMBC entre les hydrogènes de CH<sub>3</sub>-15 et le carbone C-3 à  $\delta_C$  compris entre 37-38 ppm, confirmant sa position.
- La corrélation observée en HMBC entre les hydrogènes H-9a/b (CH<sub>2</sub>,  $\delta_C$  38 ppm) et C-8, confirmant la position de C-9.
- La corrélation observée en HMBC entre H-3a et le carbone C-2 à  $\delta_C$  compris entre 31-32 ppm, confirmant également sa position.
- Deux signaux de carbones tertiaires à  $\delta_C$  124-125 ppm, pour le carbone vinylique C-5 et  $\delta_C$  63-66 ppm (C-8).



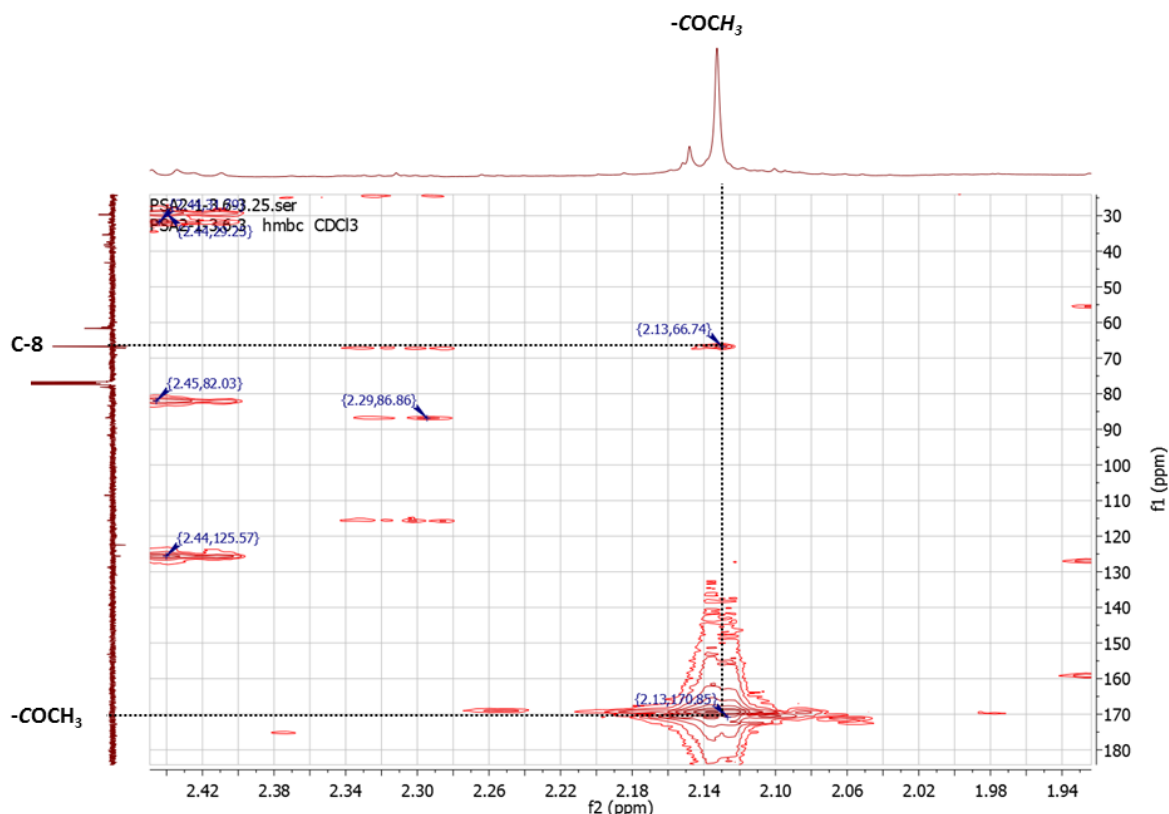
**Figure 62** : Schéma des corrélations HMBC observées pour les hirsutinolides isolés

Les corrélations HMBC observées pour le composé **PS9** en particulier (**Figure 63** et **Figure 64**) permettent d'attribuer les positions des groupements acétyle et de la fonction éthoxyle sur la molécule.

- Les hydrogènes méthyléniques de la fonction  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$  présentent des taches de corrélation avec le carbone C-13. Il s'agit donc du substituant  $\text{R}_1$ .
- Les hydrogènes méthyliques de la fonction  $-\text{COCH}_3$  présentent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire de l'acétyle et le carbone C-8. Il s'agit donc du substituant  $\text{R}_2$ .

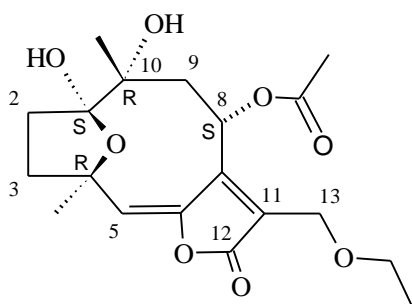


**Figure 63** : Corrélations HMBC observées pour la fonction  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$  du composé **PS9** ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 500 MHz)



**Figure 64** : Corrélations HMBC observées pour la fonction  $-\text{COCH}_3$  du composé **PS9** ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 500 MHz)

L'analyse des spectres de RMN 2D HSQC, HMBC nous permet d'identifier le composé **PS9** comme étant le 8-acétyl-13-éthoxyptocarphol (**Figure 65**). Ceci est confirmé par comparaison avec les données de la littérature (Catalán *et al.*, 1986), la stéréochimie du carbone C8\* ayant été corrigée en 1988 (Catalán *et al.*, 1988). Ce composé a précédemment été isolé à partir de nombreuses espèces (Buskuhl *et al.*, 2010 ; Catalán *et al.*, 1986 ; Valdés *et al.*, 1998 ; Borkosky *et al.*, 1996) et notamment de *P. spicatus* (Odonne *et al.*, 2011).

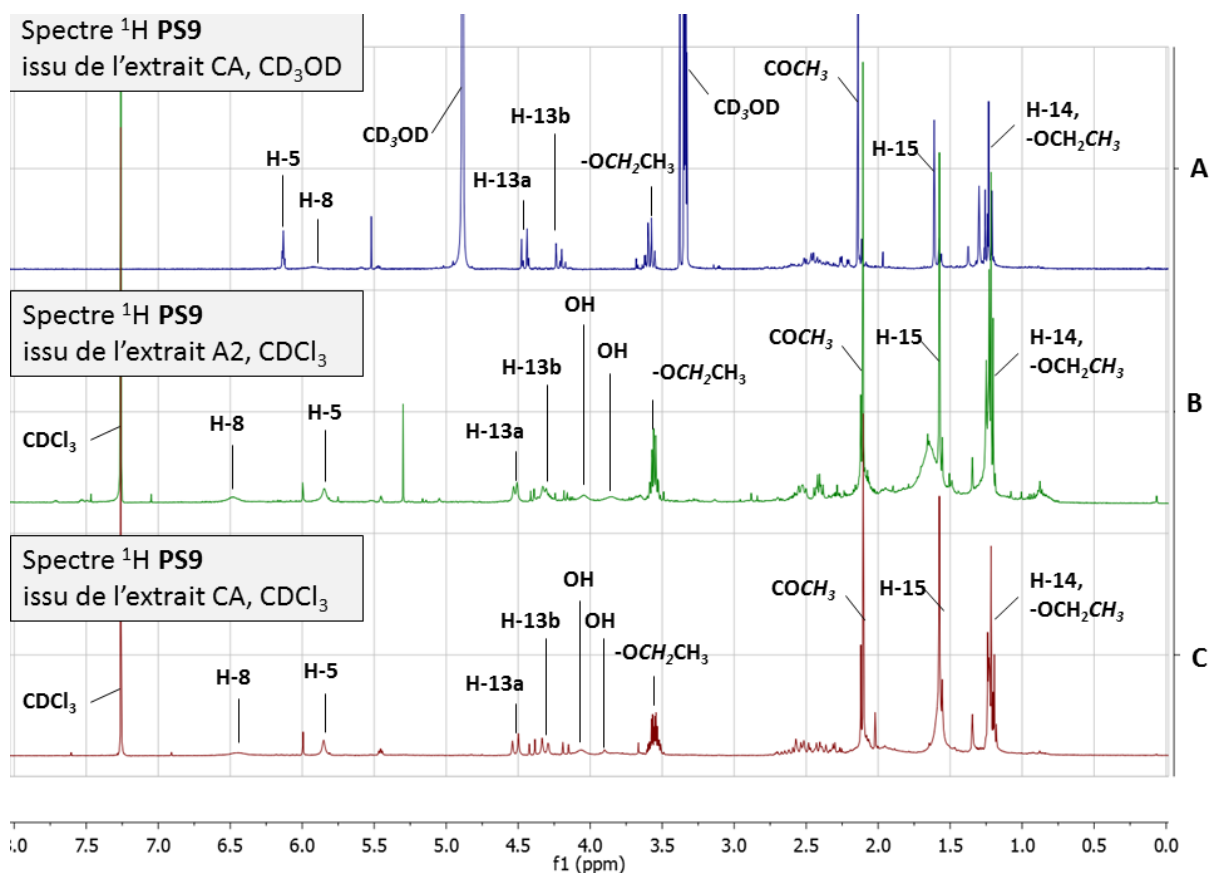


**Figure 65** : Structure du 8-acétyl-13-éthoxyptocarphol, **PS9** (n° CAS 151593-37-2)

On peut noter (d'après les spectres  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) que le composé **PS9** ne semble pas pur. Les analyses de RMN de ce composé ont été réitérées sur plusieurs échantillons repurifiés par HPLC préparative, afin d'obtenir un spectre de meilleure qualité. On note à chaque fois la



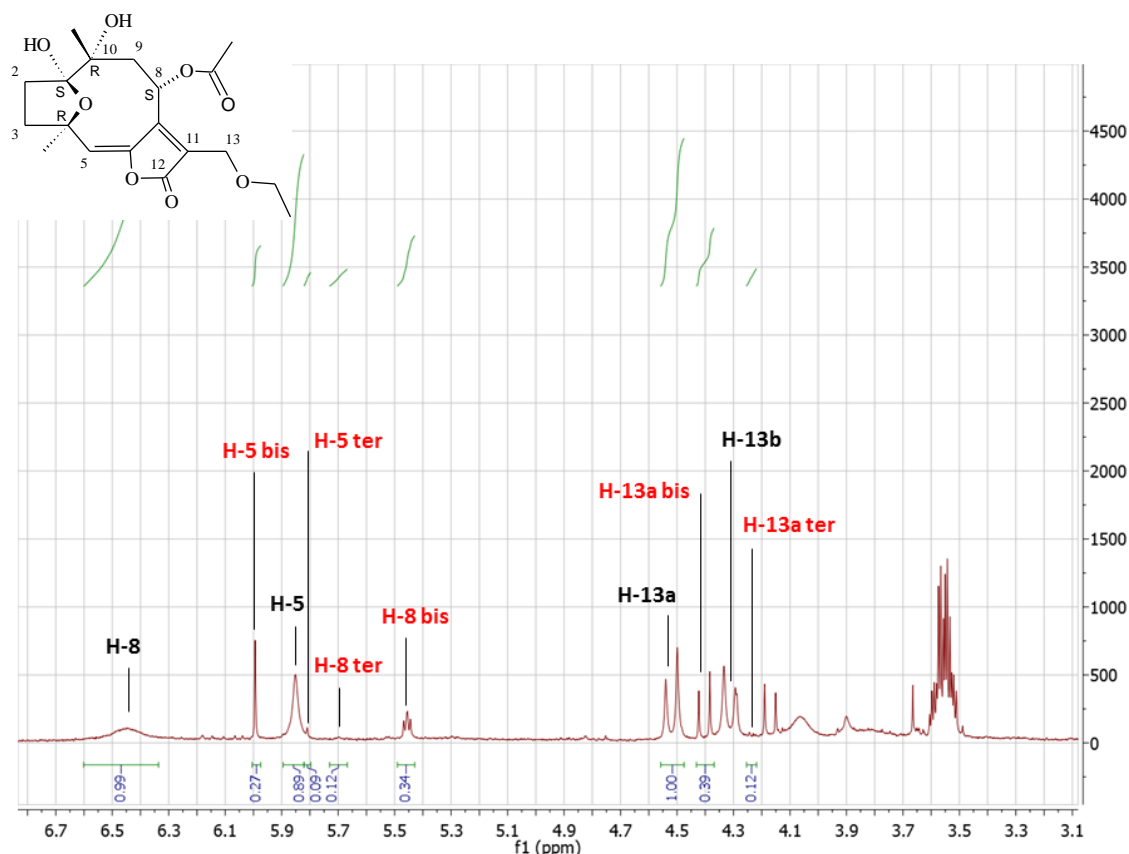
persistance de signaux minoritaires sur les spectres de RMN  $^1\text{H}$ , quelles que soient les conditions de solvant et de température. La **Figure 66** permet d'illustrer ce propos.



**Figure 66** : Comparaison des spectres de RMN  $^1\text{H}$  obtenus pour le composé **PS9**, issu de deux fractionnements différents.

**A** : spectre de **PS9** issu de l'extrait CA ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 298 K, 300 MHz) ; **B** : spectre de **PS9** issu de l'extrait A2 ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 500 MHz) ; **C** : spectre de **PS9** issu de l'extrait CA ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 300 MHz).

Finalement, ces analyses nous ont permis d'identifier deux séries de pics (**Figure 67**). Une série, que nous appellerons « bis », présente une intensité d'environ 40% du signal principal (correspondant à **PS9**) et l'autre série de pics, dits « ter », a une intensité correspondant à environ 10% du signal principal. Il est très probable que ces pics soient dus à une instabilité du composé **PS9** dans le solvant de RMN, puisqu'il s'est complètement dégradé par la suite.



**Figure 67** : Comparaison des intensités obtenues pour les signaux « parasites » présents sur le spectre proton du composé **PS9** ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 300 MHz).

### III. 2. Détermination structurale de **PS11**

Le composé **PS11** a été isolé sous forme d'une huile incolore. En CCM, **PS11** possède un rapport frontal de 0,57 lorsque la plaque CCM est éluée avec un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (95:5) comme solvant de migration. Le composé est révélé sous UV à 254 nm et apparaît sous la forme d'une tache marron/grise après révélation à la vanilline sulfurique.

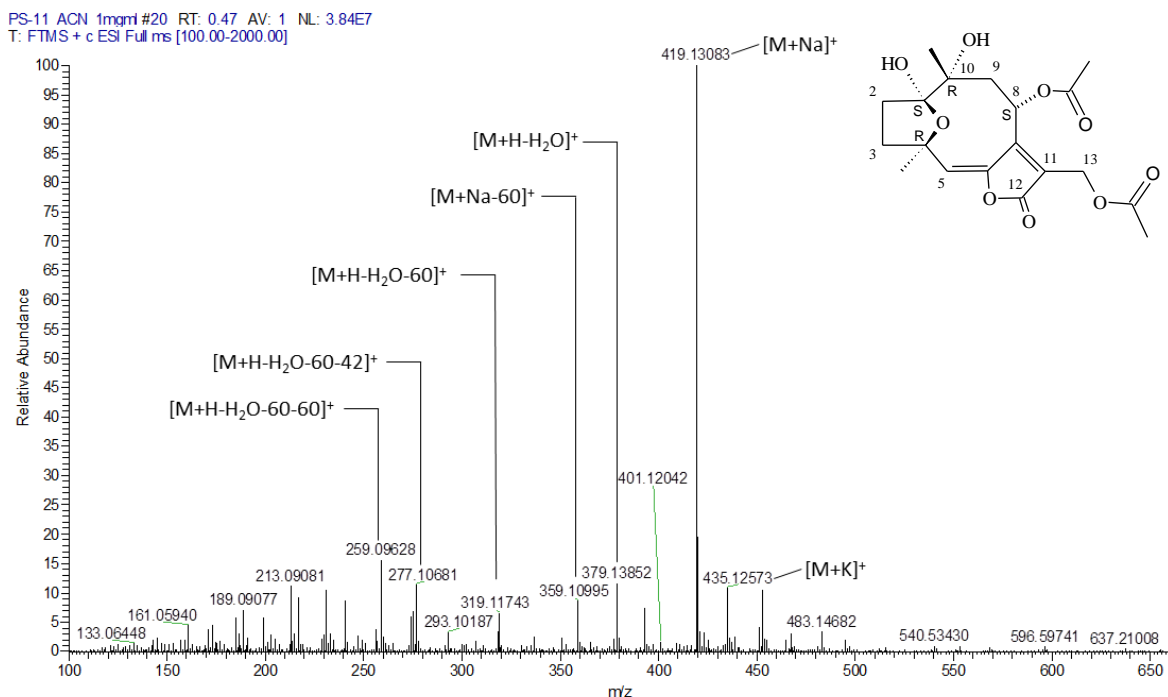
#### III. 2.1. Spectroscopie de masse

Le spectre de masse obtenu en mode ESI positif (**Figure 68**) présente un ion majoritaire de  $m/z$  419 correspondant à l'adduit sodé  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . On note la présence de l'ion  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  de  $m/z$  379. Ces informations permettent de proposer pour le composé **PS11** une masse atomique de 396 uma.

Quatre ions fragments majoritaires sont présents de  $m/z$  359,  $m/z$  319,  $m/z$  277 et  $m/z$  259. Les ions à  $m/z$  359 et 319 proviennent le plus probablement de la perte d'un groupement acétyle, respectivement à partir de l'ion pseudo-moléculaire  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  et de l'ion fragment  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ . L'ion présent à  $m/z$  259 provient le plus vraisemblablement des pertes successives de deux groupements acétyles à partir du fragment  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , ce qui semble être confirmé par la présence de l'ion de  $m/z$  277 correspondant à la perte de neutre de 42 uma à partir de

l'ion  $[M+H-H_2O-60]^+$  à  $m/z$  319 et correspondant au départ d'un groupement cétène  $O=C=CH_2$ .

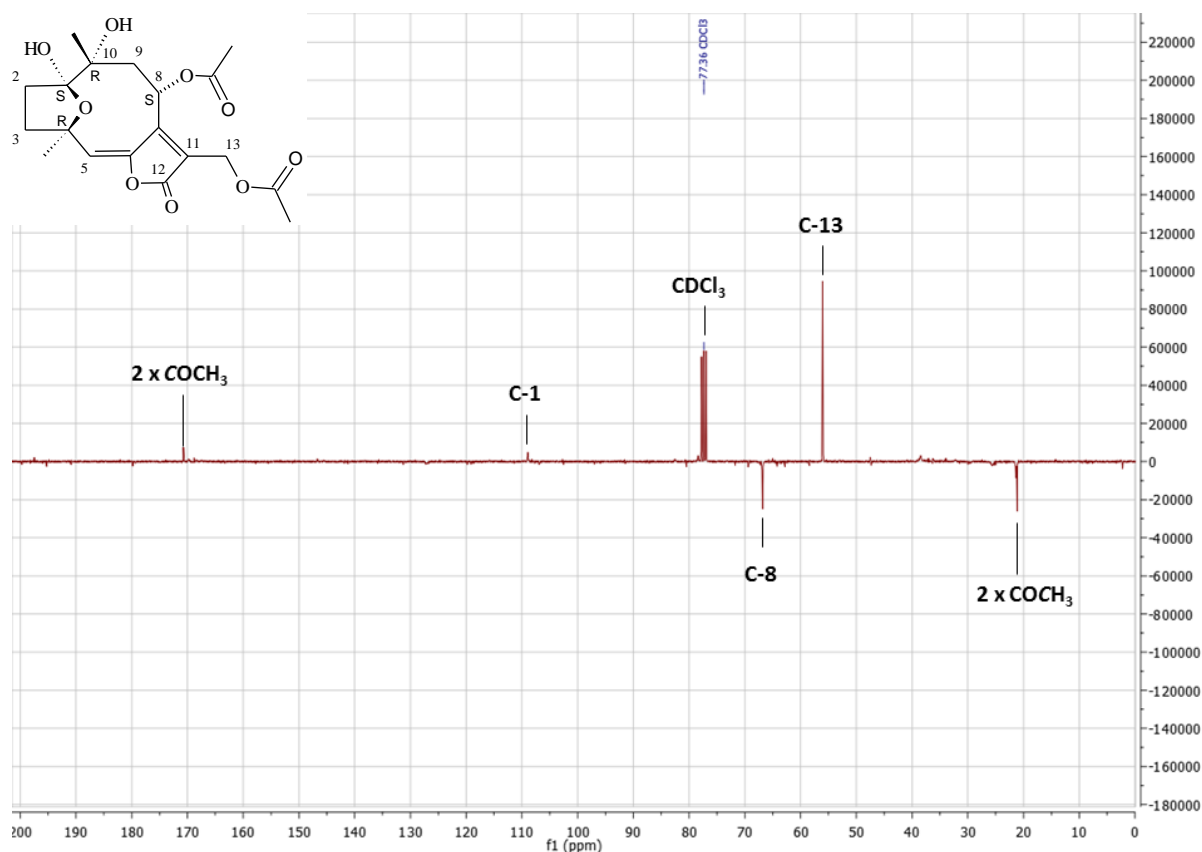
Le spectre de masse haute résolution obtenu permet de suggérer la formule brute  $[C_{19}H_{24}O_9+Na]^+$  calculée pour l'adduit sodium à  $m/z$  405,13083, la masse calculée pour  $C_{19}H_{24}O_9Na$  étant de 419,13125 uma. Le degré d'insaturation de la molécule est donc de 8. Le noyau hirsutinolide présentant 6 insaturations, les deux insaturations supplémentaires sont en accord avec l'hypothèse de deux substituants de nature acétyle.



**Figure 68 :** Spectre de masse du composé **PS11** obtenu en mode ESI positif

### III. 2.2. Spectrométrie de RMN

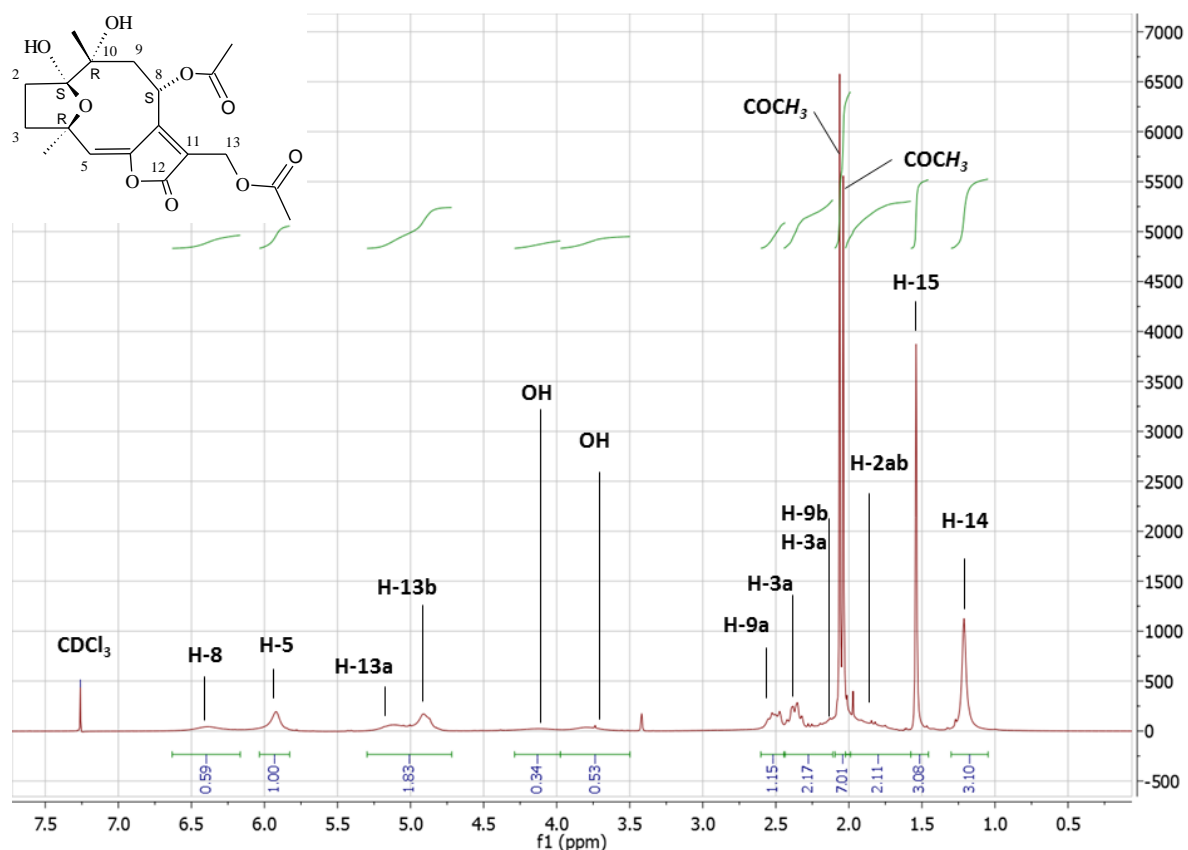
Le spectre de RMN du  $^{13}C$  (voir **Figure 69**) enregistré en *J-modulé* dans le  $CDCl_3$  indique la présence de 7 atomes de carbone seulement sur les 19 attendus, dont 3 signaux de carbones quaternaires, 1 CH, 1 méthylène et 2 méthyles. Parmi ces signaux, on note la présence de méthyles à  $\delta_C$  21,1 et 21,3 ppm et un signal quaternaire relativement intense à  $\delta_C$  170,7 ppm, correspondant probablement aux signaux superposés des carbonyles de deux fonctions acétyles.



**Figure 69** : Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  en *J*-modulé du composé **PS11** (298 K, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Le spectre  $^1\text{H}$  du composé **PS11** est présenté à la **Figure 70**. L'ensemble des signaux attendus pour le noyau hirsutinolide, décrits en détails pour le composé **PS9** (III.1.2), sont présents. Certains signaux apparaissent élargis comme cela a déjà été signalé auparavant. On note pour **PS11** :

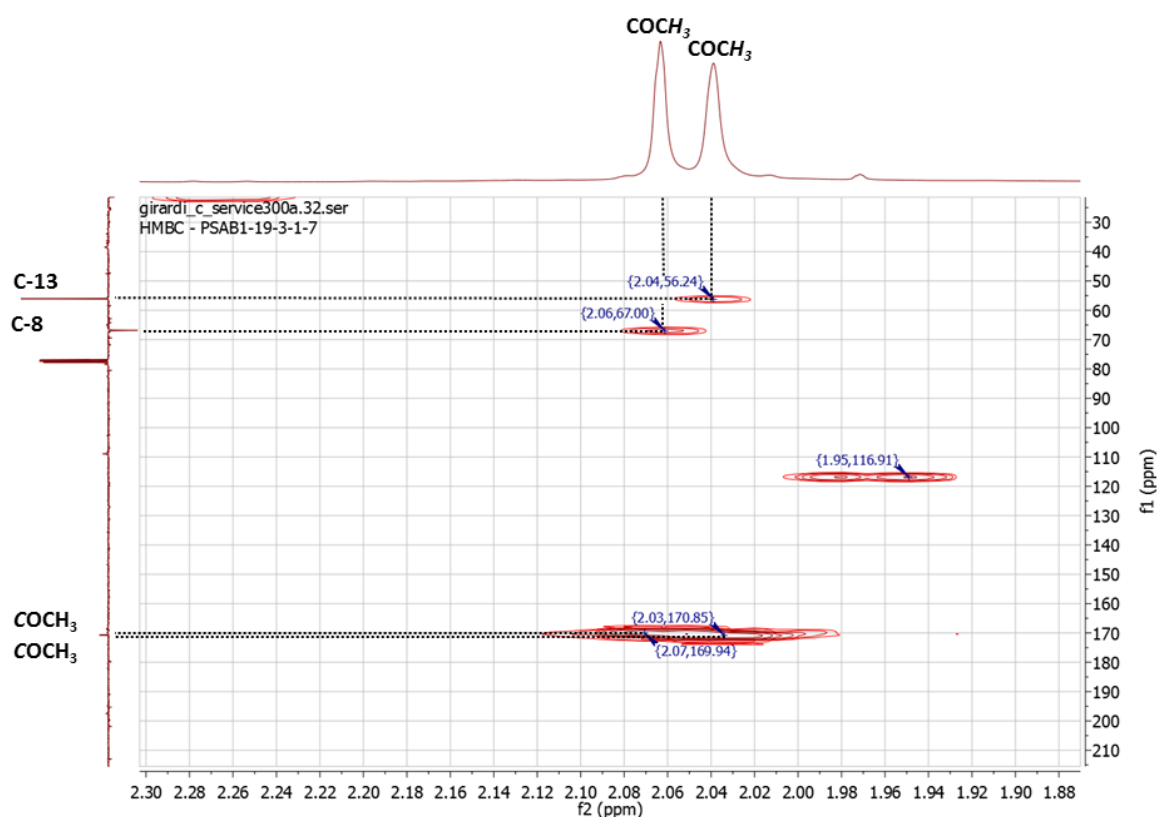
- Deux singulets d'intensité 3H, présents à des déplacements chimiques  $\delta_{\text{H}}$  2,04 et 2,06 ppm, correspondant le plus probablement aux deux groupements méthyles des deux fonctions acétates présentes dans la molécule.



**Figure 70** : Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé **PS11** (298 K, 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

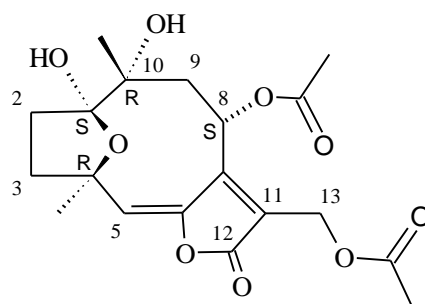
Les corrélations HMBC observées pour le composé **PS11** (**Figure 71**) permettent d'attribuer les positions des deux groupements acétyles dans la molécule.

- Les hydrogènes méthyliques à  $\delta_{\text{H}}$  2,04 présentent des tâches de corrélation avec le carbone quaternaire de l'acétyle à 170,7 et avec le carbone C-13. Il s'agit donc du substituant  $\text{R}_1$ .
- Les hydrogènes méthyliques à  $\delta_{\text{H}}$  2,06 présentent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire de l'acétyle à 169,9 et avec le carbone C-8. Il s'agit donc du substituant  $\text{R}_2$ .



**Figure 71** : Corrélations HMBC observées pour les groupements acétyles du composé **PS11** ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 300 MHz)

L'analyse des spectres de RMN 2D HSQC et HMBC nous permet d'identifier le composé **PS11** comme étant le diacétylpiptocarphol (**Figure 72**). Ceci est confirmé par comparaison avec les données de la littérature (Catalán *et al.*, 1986), la stéréochimie ayant été corrigée en 1993 (Bardón *et al.*, 1993). Ce composé a précédemment été isolé à partir de nombreuses espèces (Buskuhl *et al.*, 2010 ; Catalán *et al.*, 1986 ; Valdés *et al.*, 1998 ; Borkosky *et al.*, 1996 ; Borkosky *et al.*, 2009) et notamment de *P. spicatus* (Odonne *et al.*, 2011).



**Figure 72** : Structure du diacétylpiptocarphol, **PS11** (n° CAS 101628-29-9)

### III. 3. Détermination structurale de PS13

Le composé **PS13** a été isolé sous forme d'une huile incolore. En CCM, **PS13** possède un rapport frontal de 0,83 lorsque la plaque CCM est éluée avec un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (95:5) comme solvant de migration. Le composé est révélé sous UV à 254 nm et apparaît sous la forme d'une tache marron/grise après révélation à la vanilline sulfurique.

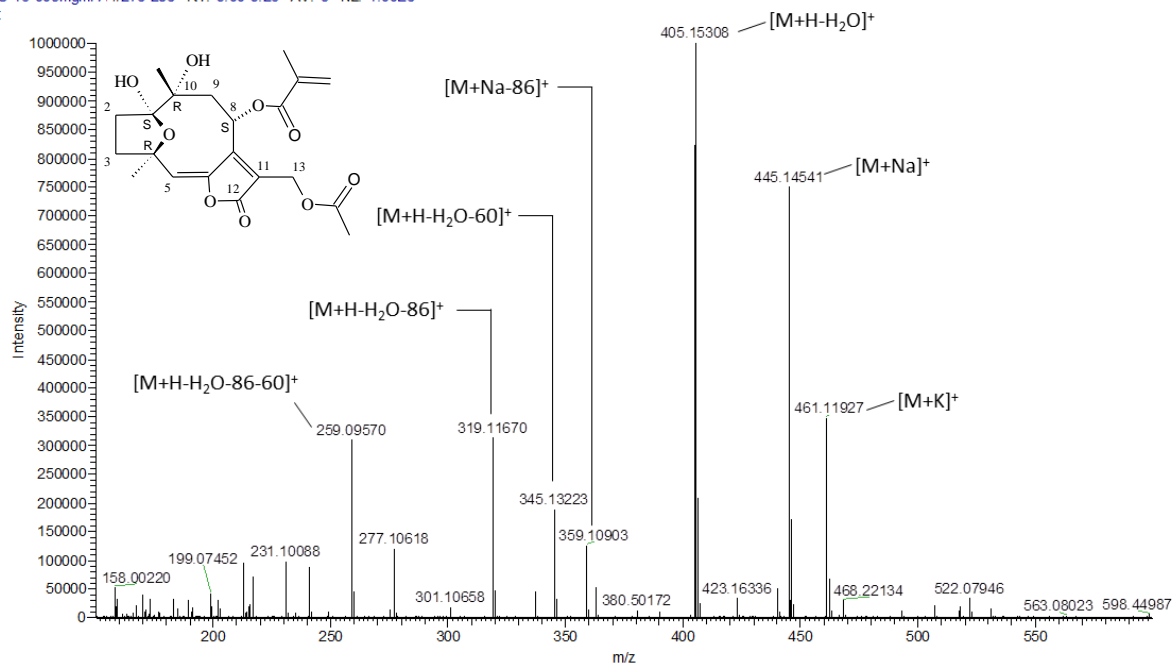
#### III. 3.1. Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse obtenu en mode ESI positif (**Figure 73**) l'adduit sodé  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  apparaît à  $m/z$  445 et un ion majoritaire de  $m/z$  405  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  est présent. Ces informations permettent de proposer pour le composé **PS13** une masse atomique de 422 uma.

Quatre ions fragments majoritaires sont présents de  $m/z$  359,  $m/z$  345,  $m/z$  319 et  $m/z$  259. Les ions à  $m/z$  359 et 319 proviennent le plus probablement de la perte d'un groupement de 86 uma, respectivement à partir des ions majoritaires  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  et  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , pouvant correspondre à la perte d'un méthacrylate. L'ion présent à  $m/z$  345 semble provenir de la perte d'un groupement acétyle à partir de  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ . L'ion de  $m/z$  259 peut être issu des pertes successives du groupement de 86 uma et d'un acétyle à partir de l'ion  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ . Par ailleurs cela est en accord avec la présence de l'ion de  $m/z$  277 correspondant à la perte de neutre de 42 uma à partir de l'ion  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-86]^+$  à  $m/z$  319 et correspondant au départ d'un groupement cétène  $\text{O}=\text{C}=\text{CH}_2$ .

Le spectre de masse haute résolution obtenu permet de suggérer la formule brute  $[\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_9+\text{Na}]^+$  calculée pour l'adduit sodium à  $m/z$  445,14541, la masse calculée pour  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_9\text{Na}$  étant de 445,14690 uma. Le degré d'insaturation de la molécule est donc de 9. Le noyau hirsutinolide présente 6 insaturations, la présence de trois insaturations supplémentaires sont en accord avec l'hypothèse d'un substituant de nature méthacrylate (2 insaturations) et d'un substituant de nature acétyle (une insaturation).

PS-13-005mgml-A #276-286 RT: 9.00-9.23 AV: 5 NL: 1.00E6  
T:



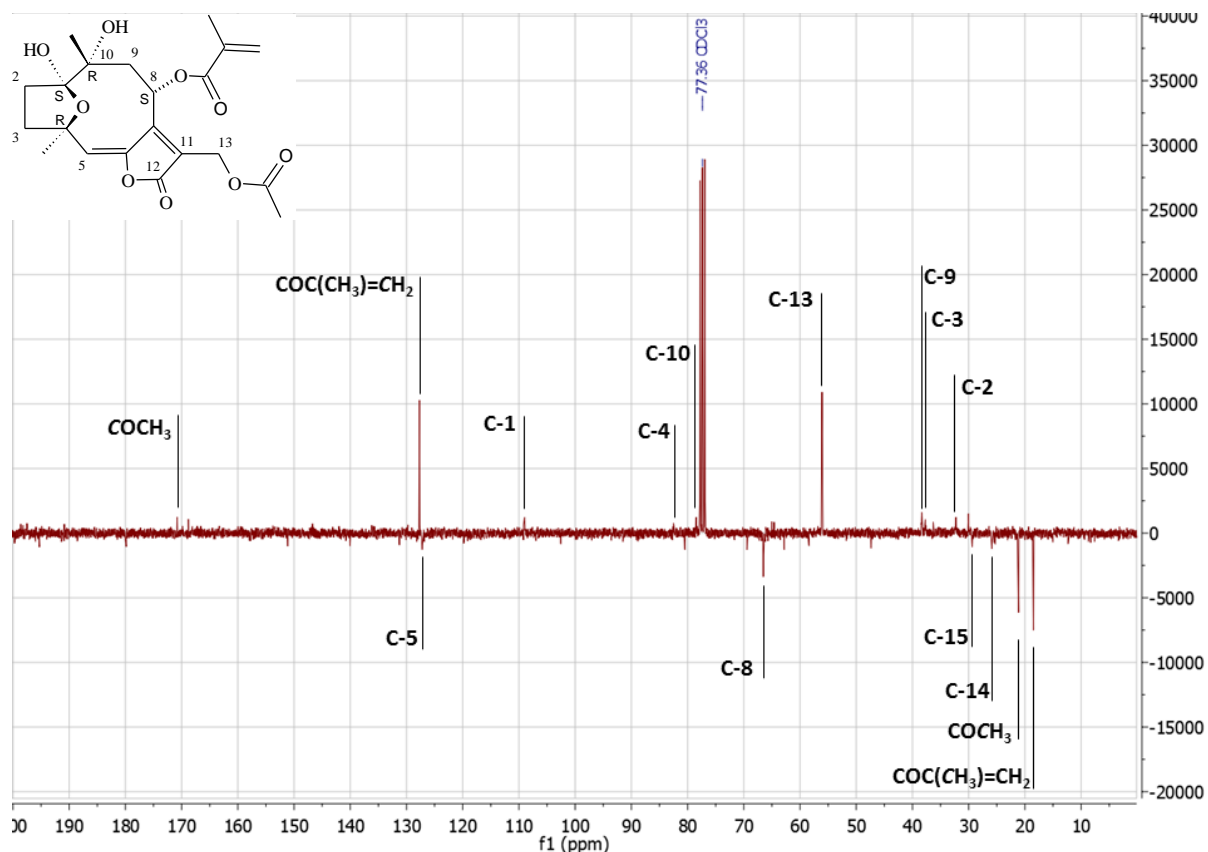
**Figure 73 :** Spectre de masse du composé **PS13** obtenu en mode ESI positif

### III. 3.2. Spectrométrie de RMN

Le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  (voir **Figure 74**) enregistré en *J-modulé* dans le  $\text{CDCl}_3$  indique la présence de 16 atomes de carbone seulement sur les 21 attendus. Parmi ces signaux, 5 ont une intensité nettement supérieure au signal du bruit :

- 2 signaux  $\text{CH}_3$ , présents à  $\delta_{\text{C}}$  21,1 et 18,4 ppm, correspondant respectivement aux méthyles du groupement acétyle et du groupement méthacrylate.
- Le signal du carbone secondaire vinylique du méthacrylate, présent à  $\delta_{\text{C}}$  127,7 ppm.
- Le signal du carbone allylique C-13, présent à  $\delta_{\text{C}}$  56,1 ppm.
- Le signal d'un carbone tertiaire, présent à  $\delta_{\text{C}}$  66,5 ppm, correspondant au carbone C-8.

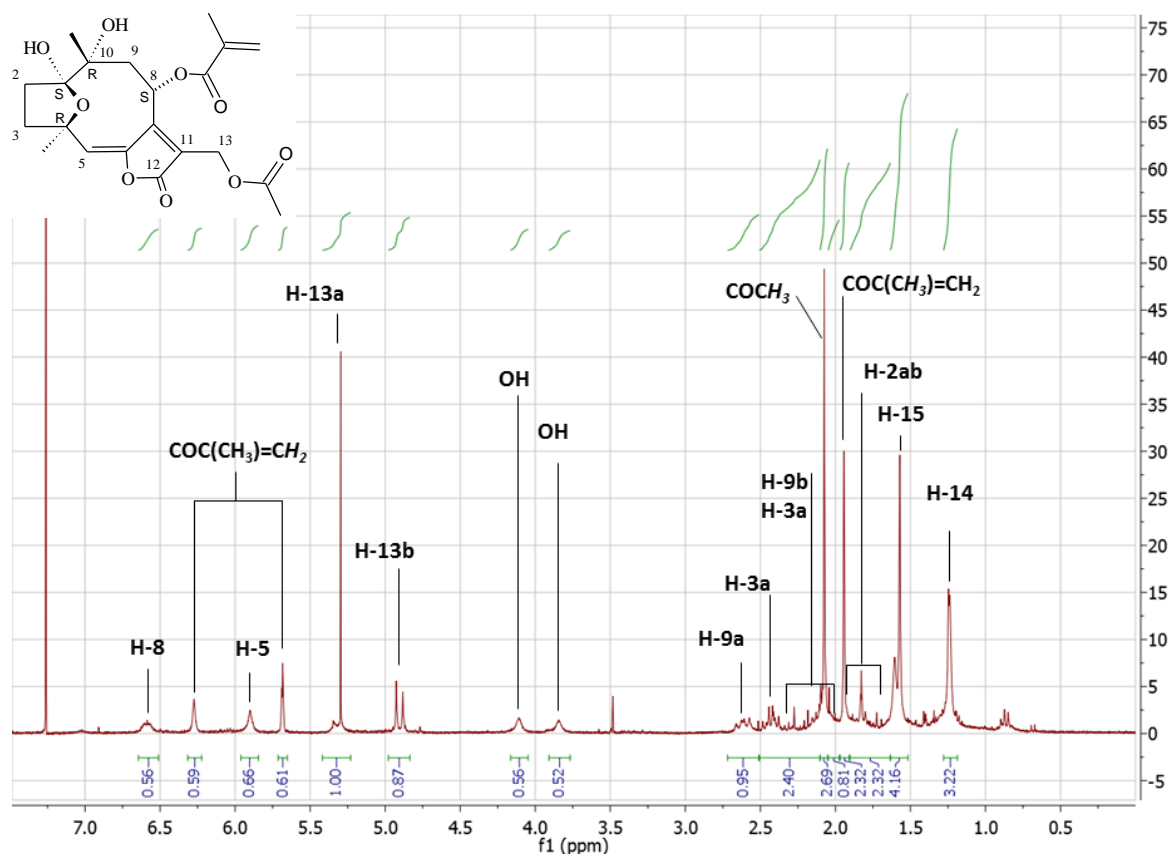




**Figure 74** : Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  en *J*-modulé du composé **PS13** (298 K, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Le spectre  $^1\text{H}$  du composé **PS13** est présenté à la **Figure 75**. L'ensemble des signaux attendus pour le noyau hirsutinolide, décrits précédemment (III.1.2), sont présents. On note pour le composé **PS13** :

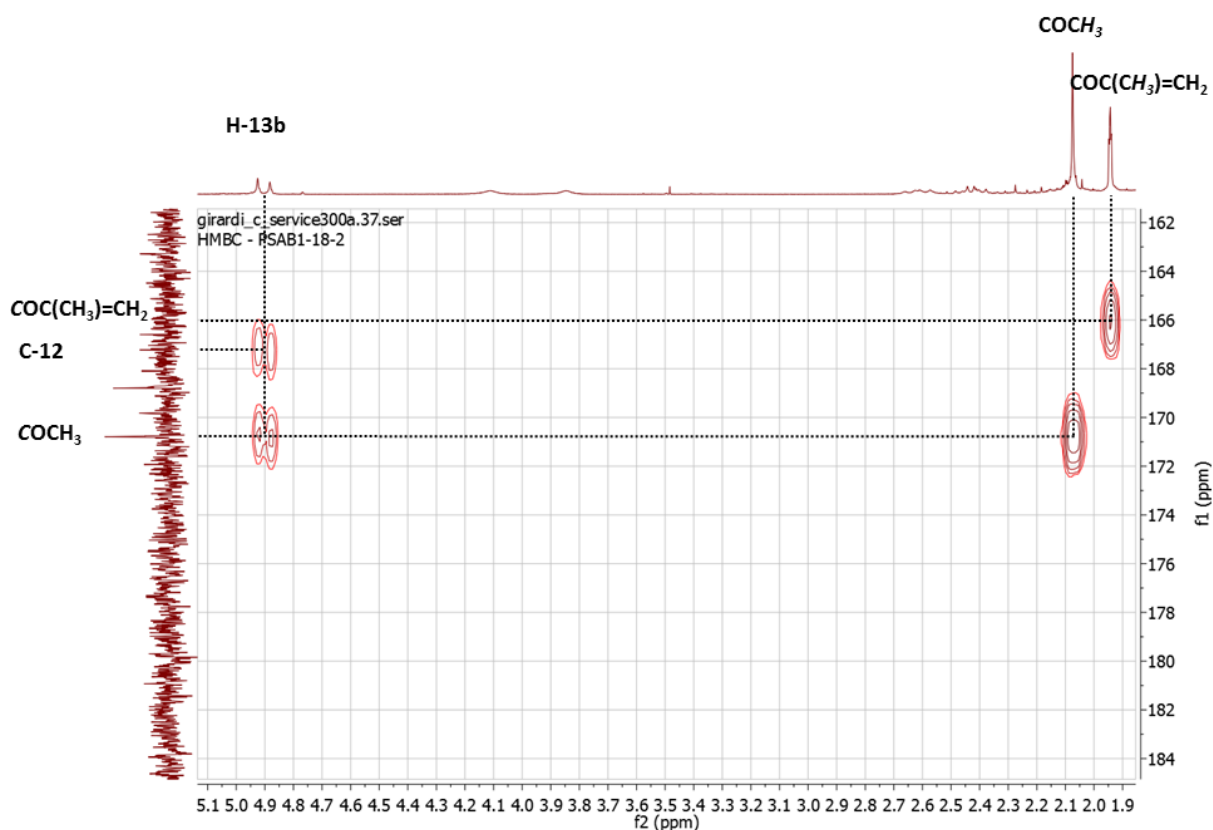
- L'élargissement de certains signaux à  $\delta_{\text{H}}$  6,59 ppm (H-8) et 5,90 ppm (H-5), de même que les signaux des hydrogènes méthyliques  $\text{CH}_3$ -15 et  $\text{CH}_3$ -14.
- Un doublet de doublet d'intensité 3H, présent à un déplacement chimique  $\delta_{\text{H}}$  1,94 ppm, correspondant le plus probablement au méthyle de la fonction méthacrylate. Il couple avec les deux hydrogènes vinyliques à  $^4J$  avec les constantes de couplage  $J=1,6$  Hz et  $J=0,9$  Hz.
- La présence d'un singulet d'intensité 3H à  $\delta_{\text{H}}$  2,07 ppm correspondant aux hydrogènes du méthyle d'un groupement acétyle.
- Le singulet large à  $\delta_{\text{H}}$  6,25 ppm et le multiplet à  $\delta_{\text{H}}$  5,68 ppm, correspondant aux signaux des deux hydrogènes vinyliques du méthacrylate.



**Figure 75** : Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé **PS13** (298 K, 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

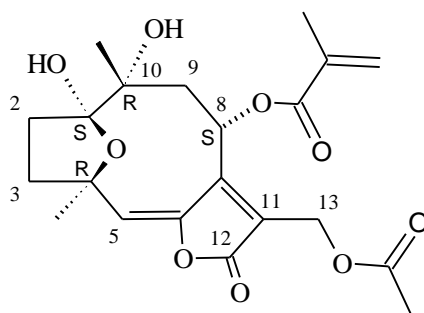
Les corrélations HMBC observées pour le composé **PS13** (**Figure 76**) permettent d'attribuer les positions des deux substituants à la molécule.

- L'hydrogène H-13b présente une tache de corrélation avec le carbone quaternaire C-12 du cycle lactone et avec le carbone quaternaire acétylique à  $\delta_{\text{C}}$  170,7 ppm. Cela indique que le groupement acétyle est en position 13 de la molécule, et qu'il s'agit donc du substituant  $\text{R}_1$ .
- Les hydrogènes vinyliques à  $\delta_{\text{H}}$  6,25 et 5,68 ppm et méthyliques à  $\delta_{\text{H}}$  1,94 ppm de la fonction méthacrylate ne présentent pas de corrélations HMBC visibles avec le noyau de la molécule. Etant donné le déblindage de l'hydrogène H-8 à  $\delta_{\text{H}}$  6,61 ppm et par comparaison avec les déplacements chimiques des autres hirsutinolides, il apparaît que la position estérifiée est la position 8. Il s'agit donc du substituant  $\text{R}_2$ .



**Figure 76** : Corrélations HMBC observées pour les substituants du composé **PS13** ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 300 MHz)

L'analyse des spectres de RMN 2D HSQC, HMBC nous permet d'identifier le composé **PS13** comme étant la piptocarphine A (**Figure 77**). Ceci est confirmé par comparaison avec les données de la littérature (Catalán *et al.*, 1986), la stéréochimie du carbone C8\* ayant été corrigée en 1988 (Catalán *et al.*, 1988). Ce composé a précédemment été isolé à partir de nombreuses espèces du genre *Vernonia* notamment (Catalán *et al.*, 1986 ; Huo *et al.*, 2008 ; Cowall *et al.*, 1981 ; Abdel-Sattar *et al.*, 1996).



**Figure 77** : Structure de la piptocarphine A, **PS13** (n° CAS 76248-63-0)

### III. 4. Détermination structurale de PS14

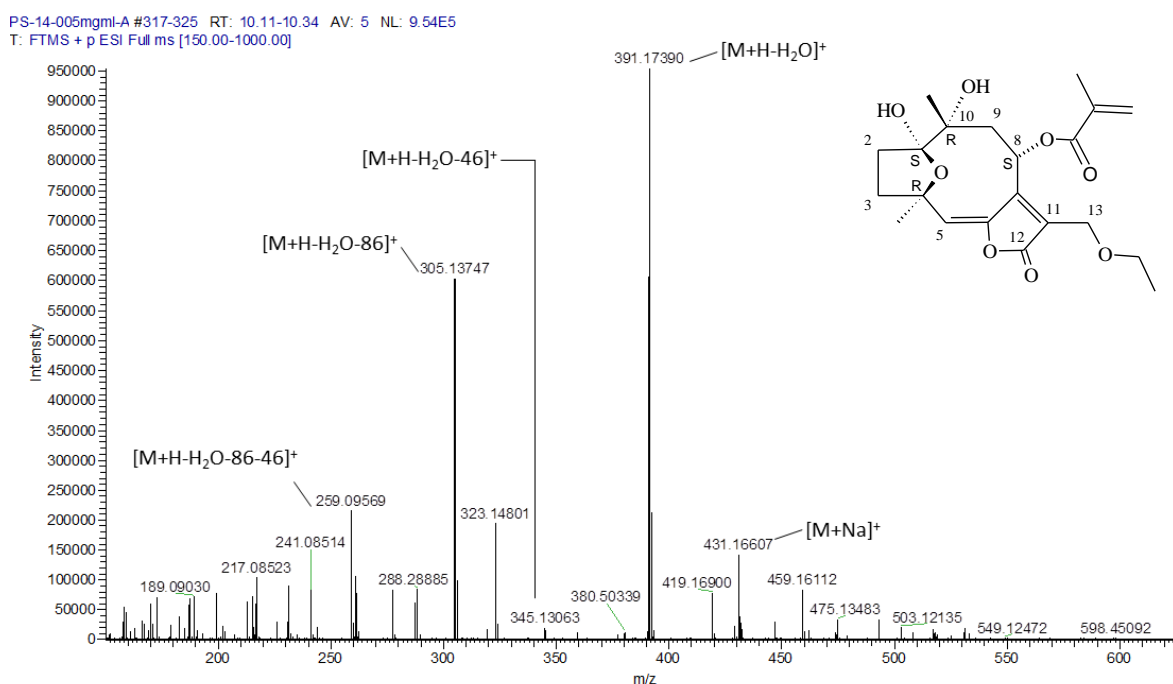
Le composé **PS14** a été isolé sous forme d'une huile jaune pâle. En CCM, **PS14** possède un rapport frontal de 0,93 lorsque la plaque CCM est éluée avec un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (95:5) comme solvant de migration. Le composé est révélé sous UV à 254 nm et apparaît sous la forme d'une tache marron/grise après révélation à la vanilline sulfurique.

#### III. 4.1. Spectrométrie de masse

Le spectre de masse obtenu en mode ESI positif (voir **Figure 78**) présente un ion  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  à  $m/z$  431 et un ion majoritaire de  $m/z$  391, correspondant à l'ion  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ . Ces informations permettent de proposer pour le composé **PS14** une masse atomique de 408 uma.

Trois ions fragments sont présents de  $m/z$  345, 305 et 259. L'ion à  $m/z$  345 provient le plus probablement de la perte d'un groupement de 46 uma à partir de  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , pouvant correspondre à une perte d'éthanol. L'ion présent à  $m/z$  305 provient de la perte d'un groupement de 86 uma à partir de  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , probablement un groupement méthacrylate, ce qui semble être confirmé par la présence pour ce composé encore de l'ion à  $m/z$  259 issu le plus vraisemblablement des pertes successives des groupements de masses 86 et 46 uma de l'ion  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ .

Le spectre de masse haute résolution obtenu permet de suggérer la formule brute  $[\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_8+\text{Na}]^+$  calculée pour l'adduit sodium à  $m/z$  431,16607, la masse calculée pour  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_8\text{Na}$  étant de 431,16764 uma. Le degré d'insaturation de la molécule est donc de 8. Le noyau hirsutinolide présente 6 insaturations, la présence de deux insaturations supplémentaires est en accord avec l'hypothèse d'un substituant de nature méthacrylate.



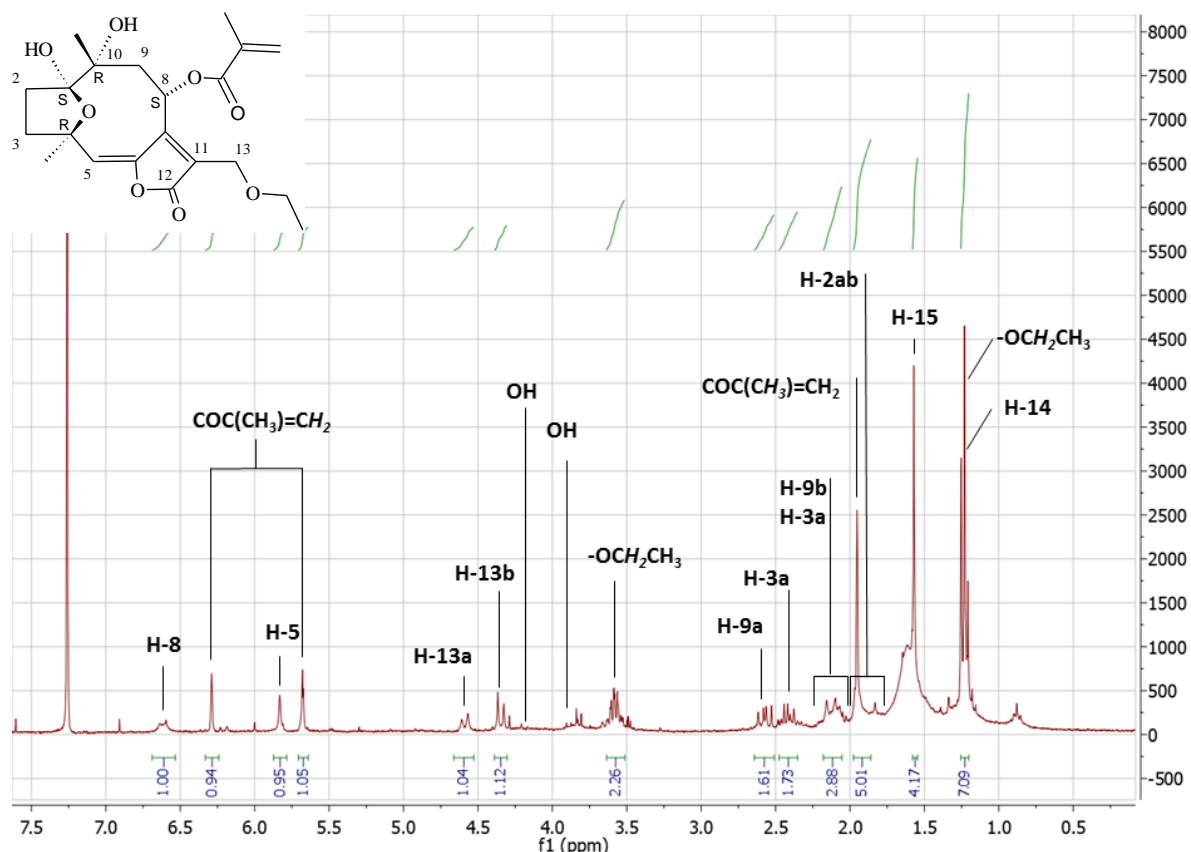
**Figure 78** : Spectre de masse du composé **PS14** obtenu en mode ESI positif

### III. 4.2. Spectrométrie de RMN

Seules les analyses de RMN  $^1\text{H}$  et HSQC ont pu être réalisées pour le composé **PS14** du fait de sa dégradation au cours des étapes d'identification.

Le spectre  $^1\text{H}$  du composé **PS14** est présenté à la **Figure 79**. L'ensemble des signaux attendus pour le noyau hirsutinolide, décrits précédemment (III.1.2), sont présents. Certains signaux à  $\delta_{\text{H}}$  6,62 ppm (H-8), 5,82 ppm (H-5) et à 1,57 ppm (H-15) apparaissent élargis comme cela a déjà été signalé auparavant. On note pour le composé **PS14** :

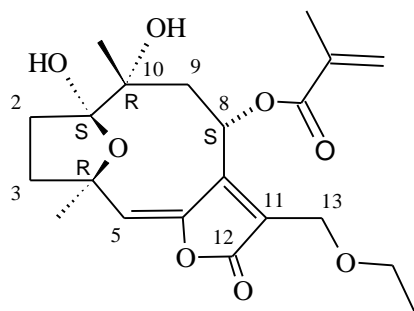
- La présence d'un doublet de doublet d'intensité 3H à un déplacement chimique  $\delta_{\text{H}}$  1,95 ppm, correspondant le plus probablement au méthyle de la fonction méthacrylate. Il couple avec les deux hydrogènes vinyliques en  $^4J$  avec les constantes de couplage  $J=1,6$  Hz et  $J=1,0$  Hz (multiplicité calculée d'après le spectre  $^1\text{H}$  obtenu dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).
- Deux signaux d'intensité 1H apparaissant à  $\delta_{\text{H}}$  6,29 ppm et à  $\delta_{\text{H}}$  5,67 ppm, comme deux multiplets peu résolus. Ces signaux correspondent aux deux hydrogènes vinyliques du méthacrylate.
- La présence d'un multiplet d'intensité 2H à  $\delta_{\text{H}}$  3,58 ppm et d'un triplet d'intensité 3H à  $\delta_{\text{H}}$  1,23 ppm,  $J=6,8$  Hz (superposé avec le signal H-14) correspondant aux signaux caractéristiques d'un groupement éthoxyle.



**Figure 79** : Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé **PS14** (298 K, 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Comme dans le cas du composé **PS9**, certains signaux « parasites » apparaissent, en dédoublement des autres signaux. Le composé **PS14** s'est également dégradé très rapidement au cours du procédé d'élucidation structurale. Ces deux molécules présentent toutes deux une fonction éthoxyle en position 13 dans leur structure. Il est probable que cette fonctionnalisation soit responsable de leur instabilité.

L'analyse des spectres de RMN 2D HSQC nous permet d'identifier le composé **PS14** comme étant la piptocarphine F (**Figure 80**). Ceci est confirmé par comparaison avec les données de la littérature (Cowall *et al.*, 1981), la stéréochimie du carbone C8\* ayant été corrigée en 1988 (Catalán *et al.*, 1988). Aucun numéro CAS ne correspond à la bonne stéréochimie du C-8, il est cependant généralement enregistré sous le numéro CAS 76215-53-7. Ce composé a précédemment été isolé à partir de plusieurs espèces, notamment *Vernonia bockiana* (Liao *et al.*, 2012 ; Huo *et al.*, 2008 ; Cowall *et al.*, 1981).



**Figure 80** : Structure de la piptocarphine F, **PS14**

### III. 5. Détermination structurale de **PS15**

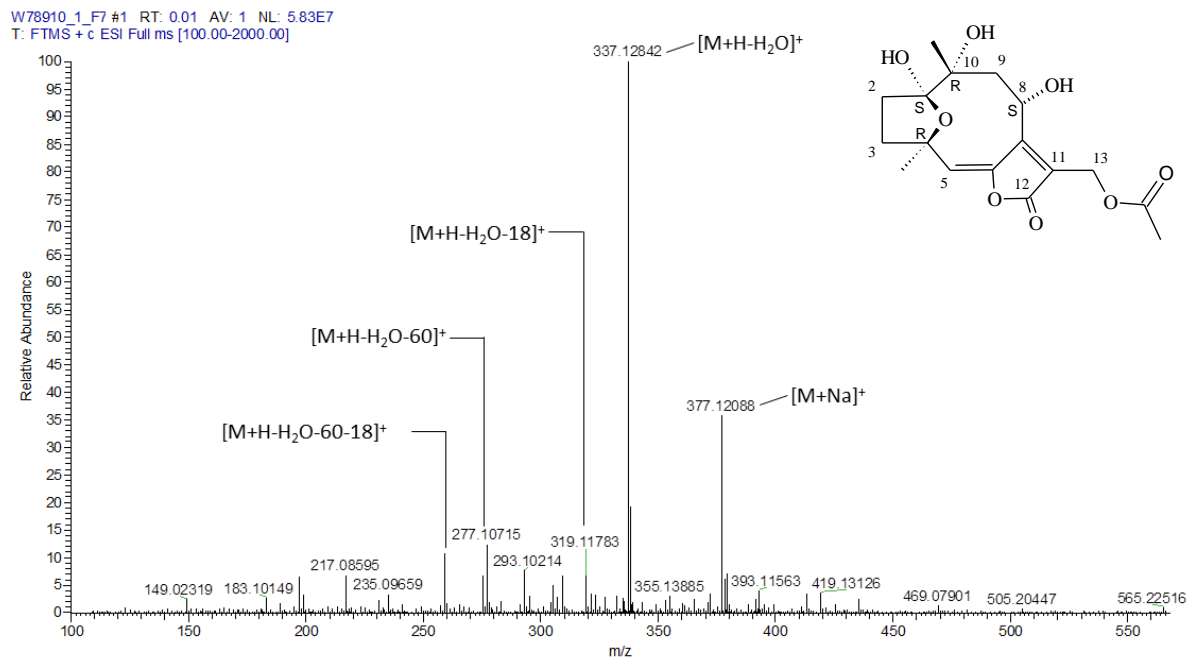
Le composé **PS15** a été isolé sous forme d'une huile jaune pâle. En CCM, **PS15** possède un rapport frontal de 0,55 lorsque la plaque CCM est éluée avec un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (95:5) comme solvant de migration. Le composé est révélé sous UV à 254 nm et apparaît sous la forme d'une tache marron/grise après révélation à la vanilline sulfurique.

#### III. 5.1. Spectrométrie de masse

Le spectre de masse obtenu en mode ESI positif (**Figure 81**) présente un ion correspondant à l'adduit sodé  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  de  $m/z$  377 et un ion majoritaire, détecté à  $m/z$  337, correspondant à l'ion  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ . Ces informations permettent de proposer pour le composé **PS15** une masse atomique de 354 uma.

Trois ions fragments sont présents à  $m/z$  319,  $m/z$  277, et  $m/z$  259. L'ion de  $m/z$  319 provient le plus probablement de la perte d'une molécule d'eau, correspondant à 18 uma, sur l'ion majoritaire  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ . L'ion de  $m/z$  277 semble provenir de la perte d'un groupement de 60 uma à partir de  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , probablement un groupement acétyle, ou de la perte de neutre de 42 uma correspondant à un cétène à partir de l'ion de  $m/z$  319  $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ . Cela semble confirmé par la présence pour ce composé également de l'ion à  $m/z$  259 issu le plus vraisemblablement des pertes successives d'une molécule d'eau et d'un groupement acétyle à partir de  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ .

Le spectre de masse haute résolution obtenu permet de suggérer la formule brute  $[\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_8+\text{Na}]^+$  mesurée pour l'adduit sodium à  $m/z$  377,12088, la masse calculée pour  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_8\text{Na}$  étant de 377,12069 uma. Cette formule brute impose donc un degré d'insaturation de 7 pour la molécule. Le noyau hirsutinolide présente 6 insaturations, la présence d'une insaturation supplémentaire est en accord avec l'hypothèse d'un substituant de nature acétyle.

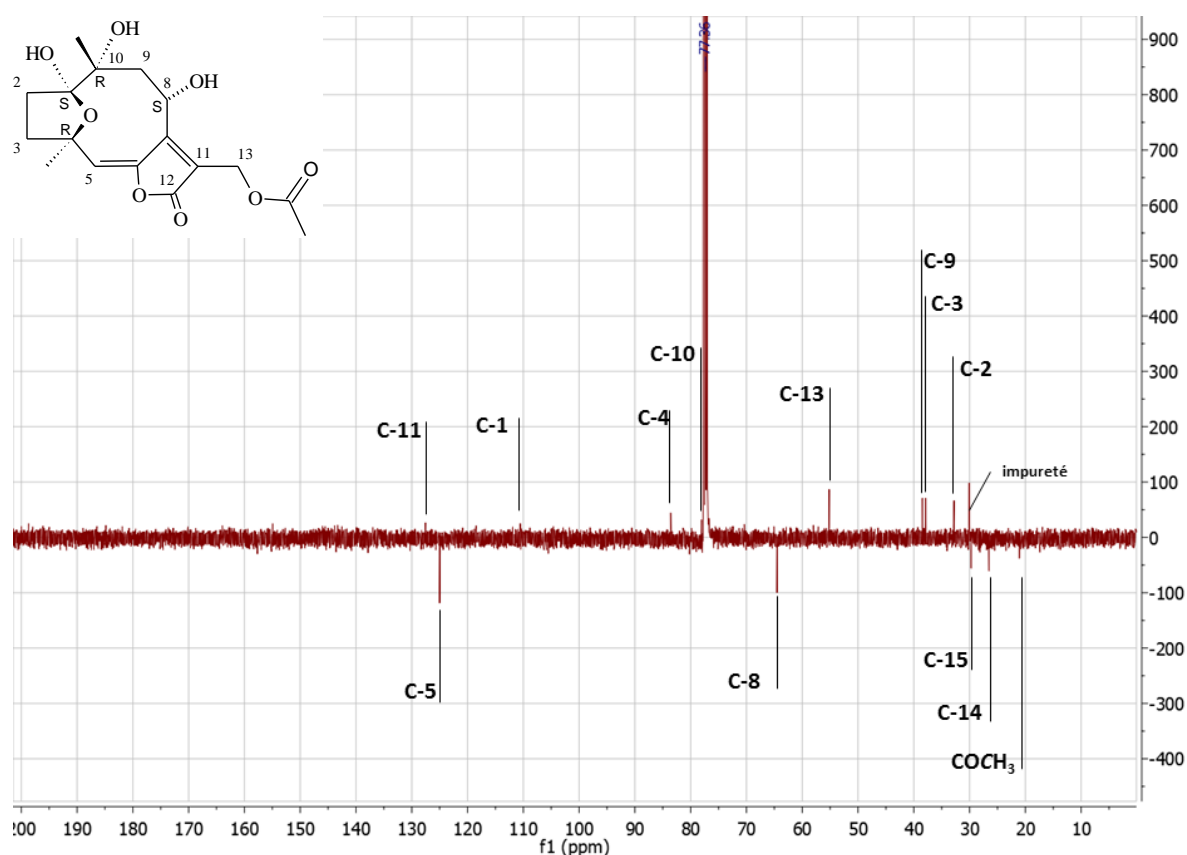


**Figure 81 :** Spectre de masse du composé **PS15** obtenu en mode ESI positif

### III. 5.2. Spectrométrie de RMN

Le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  (voir **Figure 82**) enregistré en *J-modulé* dans le  $\text{CDCl}_3$  indique la présence de 13 atomes de carbone seulement sur les 17 attendus. Parmi ces signaux, on note la présence de 3 signaux méthyles, 2 signaux de carbones tertiaires, 4 signaux de carbone secondaires, et 4 signaux correspondant à des carbones quaternaires.

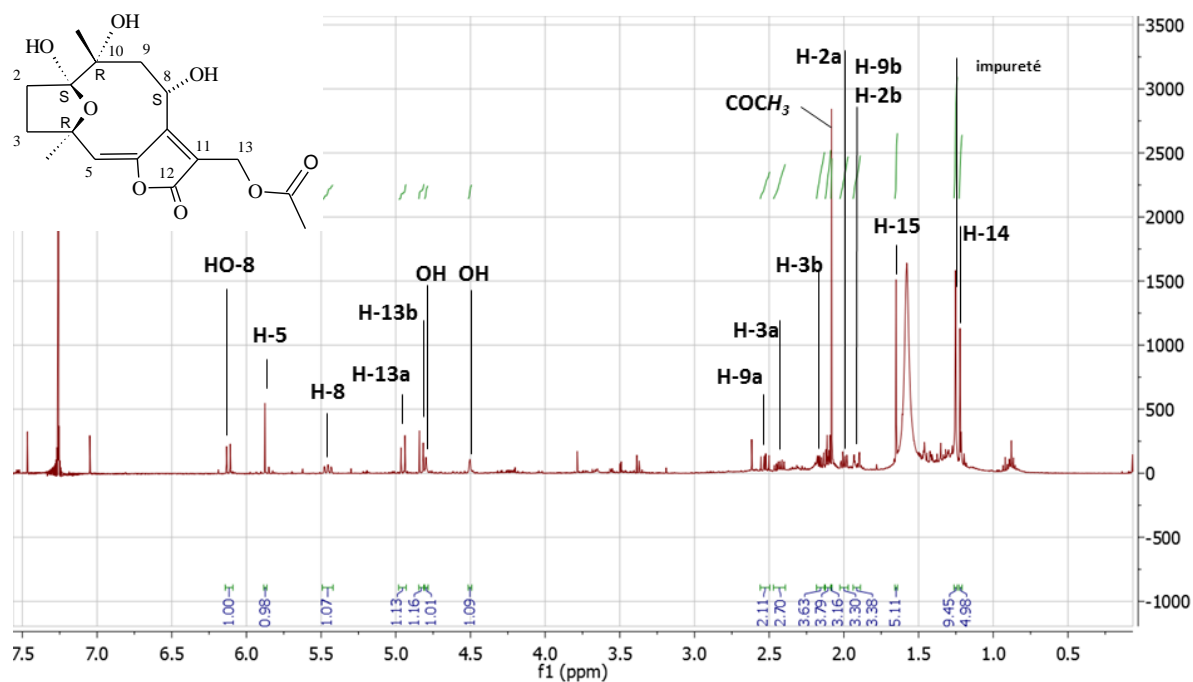




**Figure 82 :** Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  en *J*-modulé du composé **PS15** (298 K, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Le spectre  $^1\text{H}$  du composé **PS15** est présenté à la **Figure 83**. L'ensemble des signaux attendus pour le noyau hirsutinolide, décrits précédemment (III.1.2), sont présents.

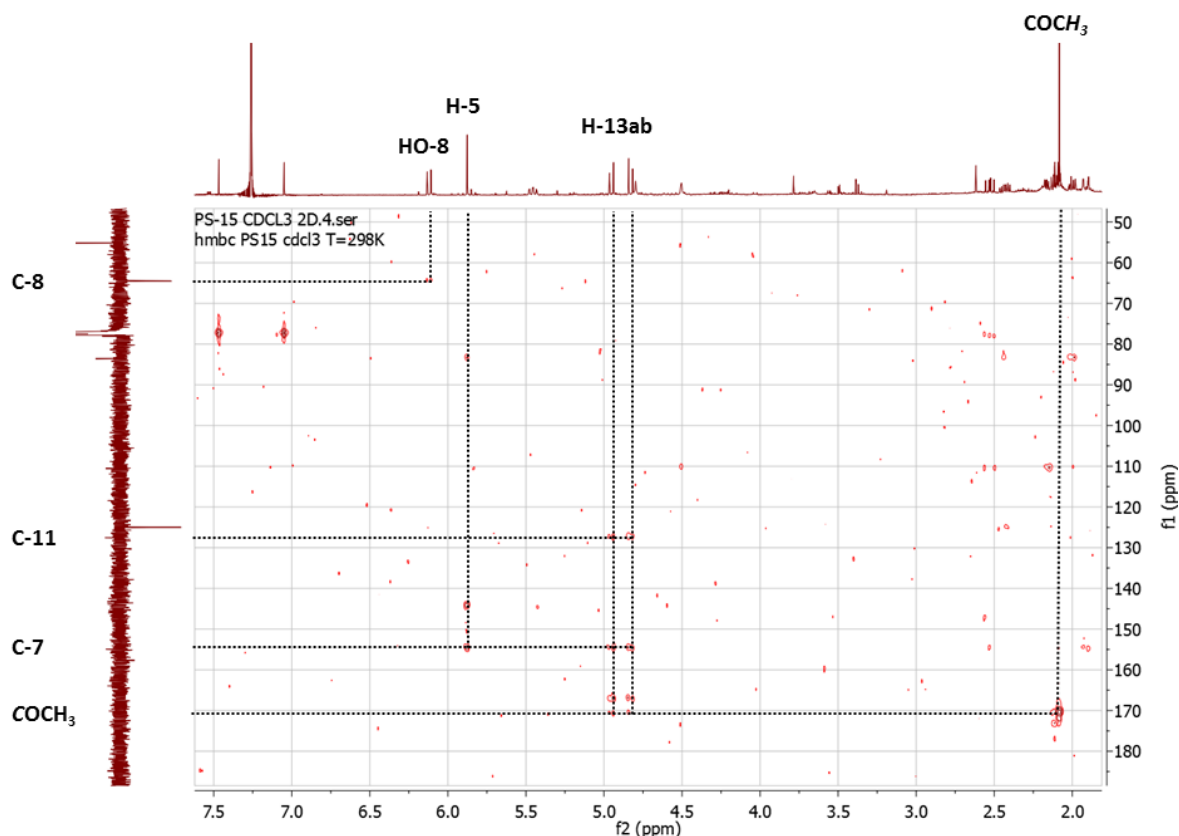
- On note la présence d'un singulet d'intensité 3H à  $\delta_{\text{H}}$  2,08 ppm correspondant aux hydrogènes du méthyle d'un groupement acétyle.
- Un doublet est présent à  $\delta_{\text{H}}$  6,12 ppm ( $J=12$  Hz), couplant avec H-8. Il s'agit vraisemblablement du proton de l'hydroxyle OH-8, engagé dans une liaison hydrogène.
- Le signal de l'hydrogène H-8 est présent à  $\delta_{\text{H}}$  5,46 ppm ( $J=12,0, 11,9, 2,1$  Hz).



**Figure 83** : Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé **PS15** (298 K, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

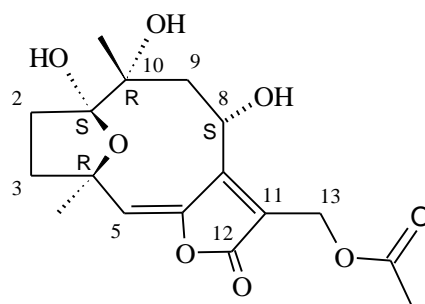
Les corrélations HMBC observées pour le composé **PS15** (**Figure 76**) permettent d'attribuer les positions des deux substituants dans la molécule :

- La tache de corrélation visible entre le carbone quaternaire de la fonction acétyle à  $\delta_{\text{C}}$  170,6 ppm et les hydrogènes allyliques H-13ab confirme la présence du substituant en position 13. Il s'agit donc du substituant  $\text{R}_1$ .
- La tache de corrélation observée entre l'hydrogène de l'hydroxyle HO-8 et C-8 confirme sa présence en position 8. Il s'agit donc du substituant  $\text{R}_2$ .



**Figure 84** : Corrélations HMBC observées pour les substituants du composé **PS15** ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 300 MHz)

L'analyse des spectres de RMN 2D HSQC, HMBC nous permet d'identifier le composé **PS15** comme étant la piptocarphine D (**Figure 85**). Ceci est confirmé par comparaison avec les données de la littérature (Cowan *et al.*, 1981), la stéréochimie du carbone C8\* ayant été corrigée en 1988 (Catalán *et al.*, 1988). Ce composé a précédemment été isolé à partir de nombreuses espèces (Chea *et al.*, 2006 ; Borkosky *et al.*, 1996 ; Catalán *et al.*, 1986 ; Cowan *et al.*, 1981 ; Kotowicz *et al.*, 1998) et notamment de l'espèce *P. spicatus* (Yang *et al.*, 2007).



**Figure 85** : Structure de la piptocarphine D, **PS15** (n° CAS 202524-98-9)

### III. 6. Détermination structurale de PS16

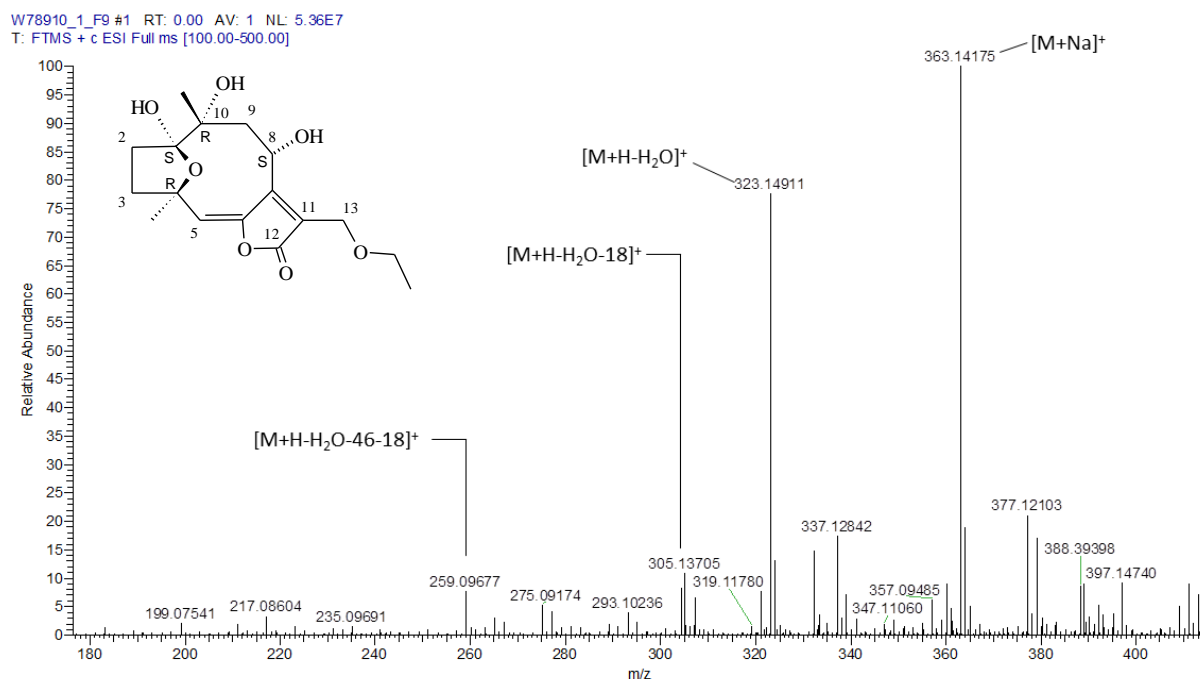
Le composé **PS16** a été isolé sous forme d'une huile jaune pâle. En CCM, **PS16** possède un rapport frontal de 0,66 lorsque la plaque CCM est éluée avec un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (95:5) comme solvant de migration. Le composé est révélé sous UV à 254 nm et apparaît sous la forme d'une tache marron/grise après révélation à la vanilline sulfurique.

#### III. 6.1. Spectroscopie de masse

Le spectre de masse obtenu en mode ESI positif (voir **Figure 86**) présente deux ions majoritaires à  $m/z$  363 et  $m/z$  323, correspondant à l'adduit sodé  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  et à l'ion  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , respectivement. Ces informations permettent de proposer pour le composé **PS16** une masse atomique de 340 uma.

Deux ions fragments sont présents à  $m/z$  305 et  $m/z$  259. L'ion de  $m/z$  305 provient le plus probablement de la perte d'une molécule d'eau à partir de l'ion majoritaire  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ . L'ion fils présent à  $m/z$  259 est issu le plus vraisemblablement des pertes successives d'une molécule d'eau et d'un groupement de 46 uma (éthoxy) à partir de  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ .

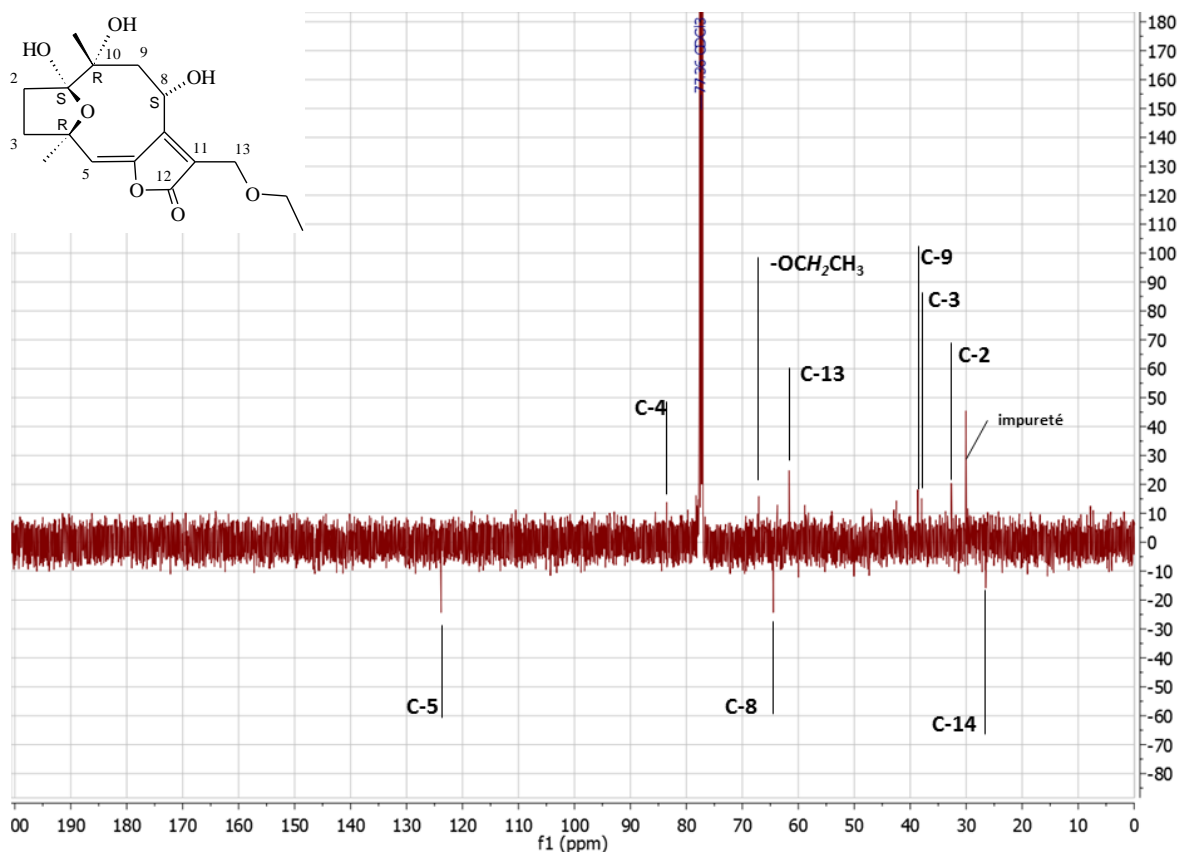
Le spectre de masse haute résolution obtenu permet de suggérer la formule brute  $[\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_7+\text{Na}]^+$  mesurée pour l'adduit sodium à  $m/z$  363,14175, la masse calculée pour  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{Na}$  étant de 363,14142 uma. Le degré d'insaturation de la molécule est donc de 6. Le noyau hirsutinolide présente 6 insaturations, indiquant qu'aucun des substituants du composé **PS16** ne présente d'insaturation.



**Figure 86** : Spectre de masse du composé **PS16** obtenu en mode ESI positif

### III. 6.2. Spectroscopie RMN

Le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  (voir **Figure 87**) enregistré en *J-modulé* dans le  $\text{CDCl}_3$  indique la présence de 9 atomes de carbone seulement sur les 17 attendus. Parmi ces signaux, on note la présence d'un signal méthyle, 2 signaux de carbones tertiaires, 5 signaux de carbones secondaires et 1 signal de carbone quaternaire.

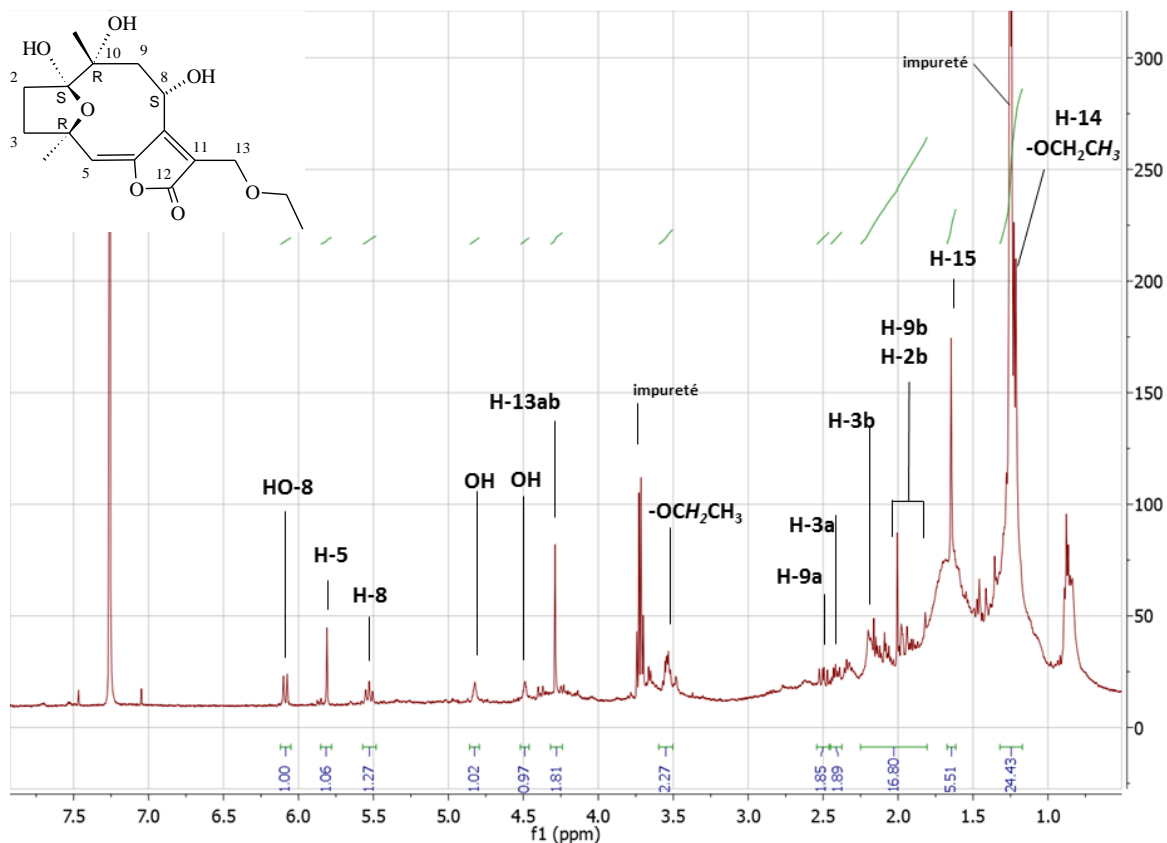


**Figure 87** : Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  en *J-modulé* du composé **PS16**  
(298 K, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Le spectre  $^1\text{H}$  du composé **PS16** est présenté à la **Figure 88**. L'ensemble des signaux attendus pour le noyau hirsutinolide, décrits précédemment (III.1.2), sont présents, bien que la ligne de base ne soit pas nette sur le spectre obtenu dans  $\text{CDCl}_3$ , rendant l'interprétation de l'intensité des signaux difficile entre 1,0 et 2,5 ppm.

- On note la présence d'un multiplet d'intensité 2H à  $\delta_{\text{H}}$  3,52 ppm correspondant aux hydrogènes méthyléniques d'un groupement éthoxyle, ce qui est en accord avec la présence d'un triplet à  $\delta_{\text{H}}$  1,23 ppm correspondant aux hydrogènes méthyliques. Ce signal est superposé aux signaux du méthyle  $\text{CH}_3$ -14 et à un contaminant (le plus probablement des traces d'éthanol).
- Un doublet est présent à  $\delta_{\text{H}}$  6,09 ppm ( $J=12$  Hz), couplant avec H-8. Là encore, il s'agit de OH-8, engagé dans une liaison hydrogène intramoléculaire.

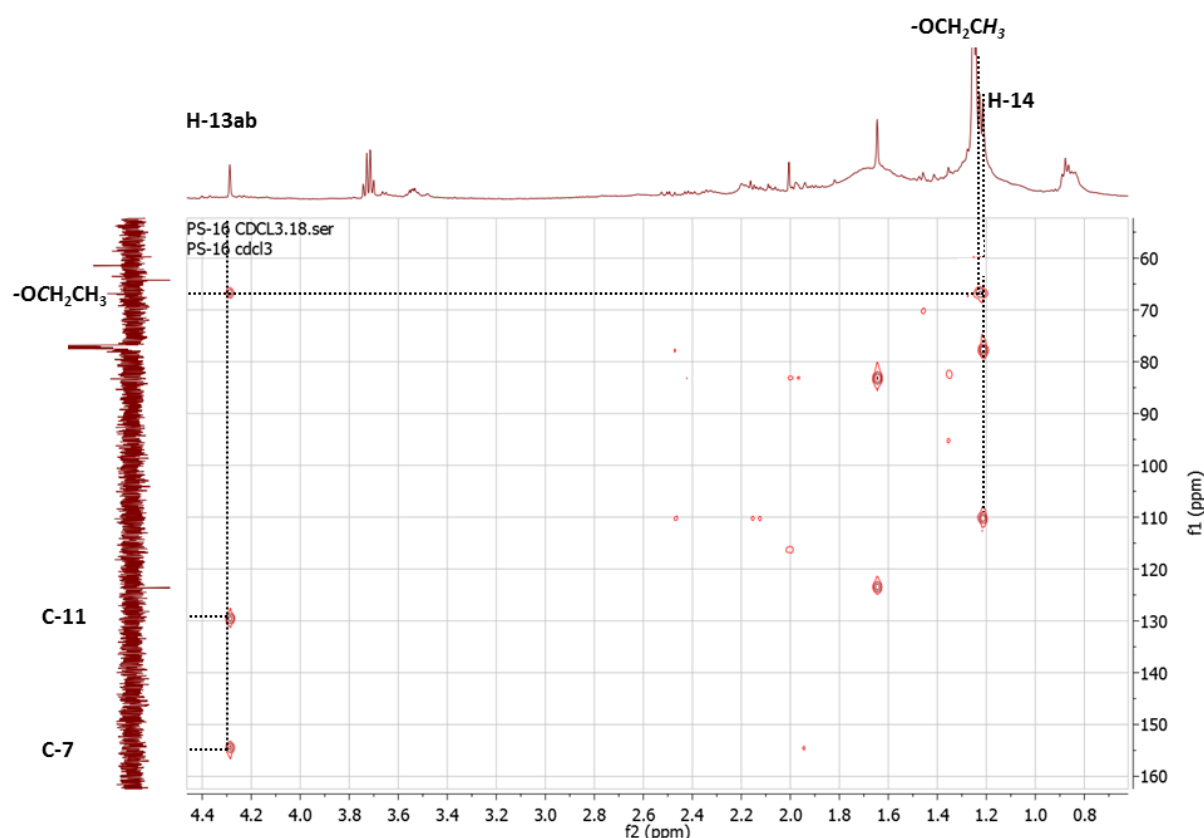
- Le signal de l'hydrogène H-8 apparaît à  $\delta_H$  5,53 ppm apparaît comme un doublet de doublet ( $J=12,0$ , et  $11,0$  Hz).



**Figure 88** : Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé **PS16**  
(298 K, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

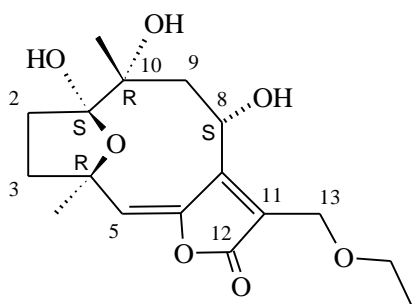
Les corrélations HMBC observées pour le composé **PS16** (**Figure 89**) permettent d'attribuer les positions des substituants :

- La tache de corrélation visible entre le carbone secondaire de l'éthoxyle et les hydrogènes allyliques H-13a/b confirme la présence de ce substituant en position 13. Il s'agit donc du substituant  $\text{R}_1$ .
- Par ailleurs, une tache de corrélation est observée entre le proton de l'hydroxyle HO-8 et C-8, confirmant la présence d'un hydroxyle en position 8. Il s'agit donc du substituant  $\text{R}_2$ .



**Figure 89** : Corrélations HMBC observées pour le substituant du composé **PS16** ( $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 500 MHz)

L'analyse des spectres de RMN 2D HSQC, HMBC nous permet d'identifier le composé **PS16** comme étant le  $(1S^*,4R^*,8S^*,10R^*)$ -1,4-époxy-13-éthoxy-1,8,10-trihydroxygermacra-5*E*,7(11)-dièn-6, 12-olide (voir **Figure 90**). Ceci est confirmé par comparaison avec les données de la littérature (Kotowicz *et al.*, 1998). Ce composé a précédemment été isolé à partir d'une seule espèce d'Asteraceae, *Vernonanthura squamulosa* (Kotowicz *et al.*, 1998).



**Figure 90** : Structure du  $(1S^*,4R^*,8S^*,10R^*)$ -1,4-époxy-13-éthoxy-1,8,10-trihydroxygermacra-5*E*,7(11)-dièn-6, 12-olide, **PS16** (n° CAS 202522-40-5)

### III. 7. Détermination structurale de PS17

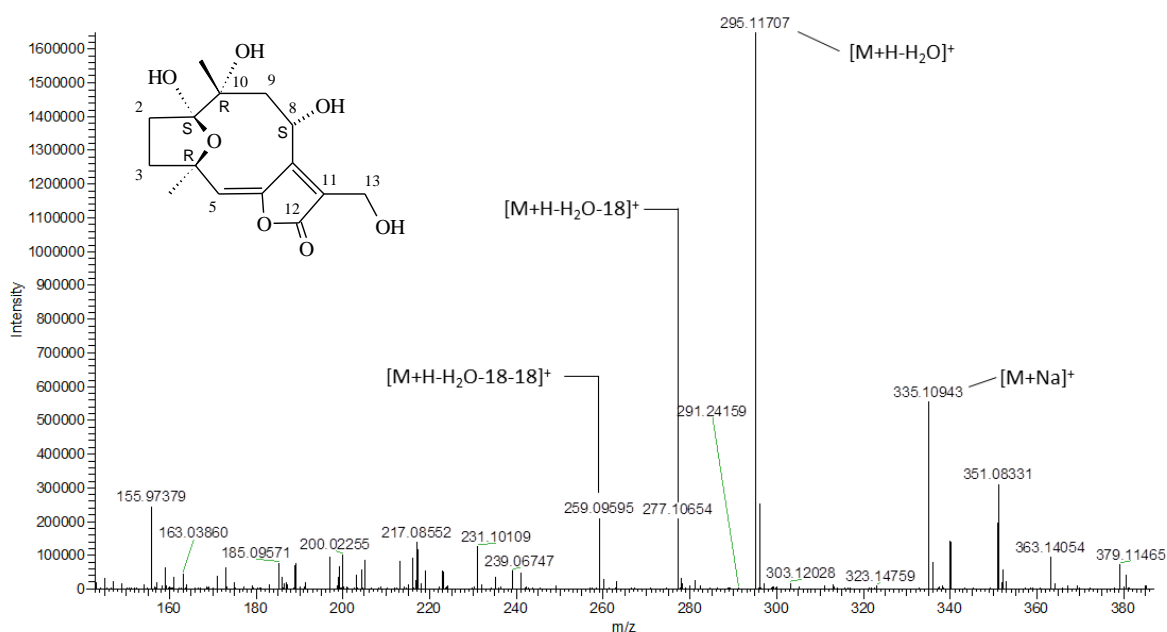
Le composé **PS17** a été isolé sous forme d'une huile jaune pâle. En CCM, **PS17** possède un rapport frontal de 0,12 lorsque la plaque de CCM est éluée avec un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (95:5) comme solvant de migration. Le composé est révélé sous UV à 254 nm et apparaît sous la forme d'une tache marron/grise après révélation à la vanilline sulfurique.

#### III. 7.1. Spectroscopie de masse

Sur le spectre de masse obtenu en mode ESI positif (**Figure 91**) sont détectés l'adduit sodé de la molécule  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  de  $m/z$  335 ainsi que l'ion majoritaire  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  de  $m/z$  295. Ces informations permettent de proposer pour le composé **PS17** une masse atomique de 312 uma.

Les ions fragments présents à  $m/z$  277 et 259 sont interprétés comme étant dus à la perte successive de deux molécules d'eau, soit  $2 \times 18$  uma, à partir de  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ .

Le spectre de masse haute résolution permet de suggérer la formule brute  $[\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_7+\text{Na}]^+$  mesurée pour l'adduit sodium à  $m/z$  335,10943, la masse calculée pour  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_7\text{Na}$  étant de 335,11012 uma. Le degré d'insaturation de la molécule est donc de 6. Le noyau hirsutinolide présentant 6 insaturations, **PS17** ne présente pas d'insaturation supplémentaire.

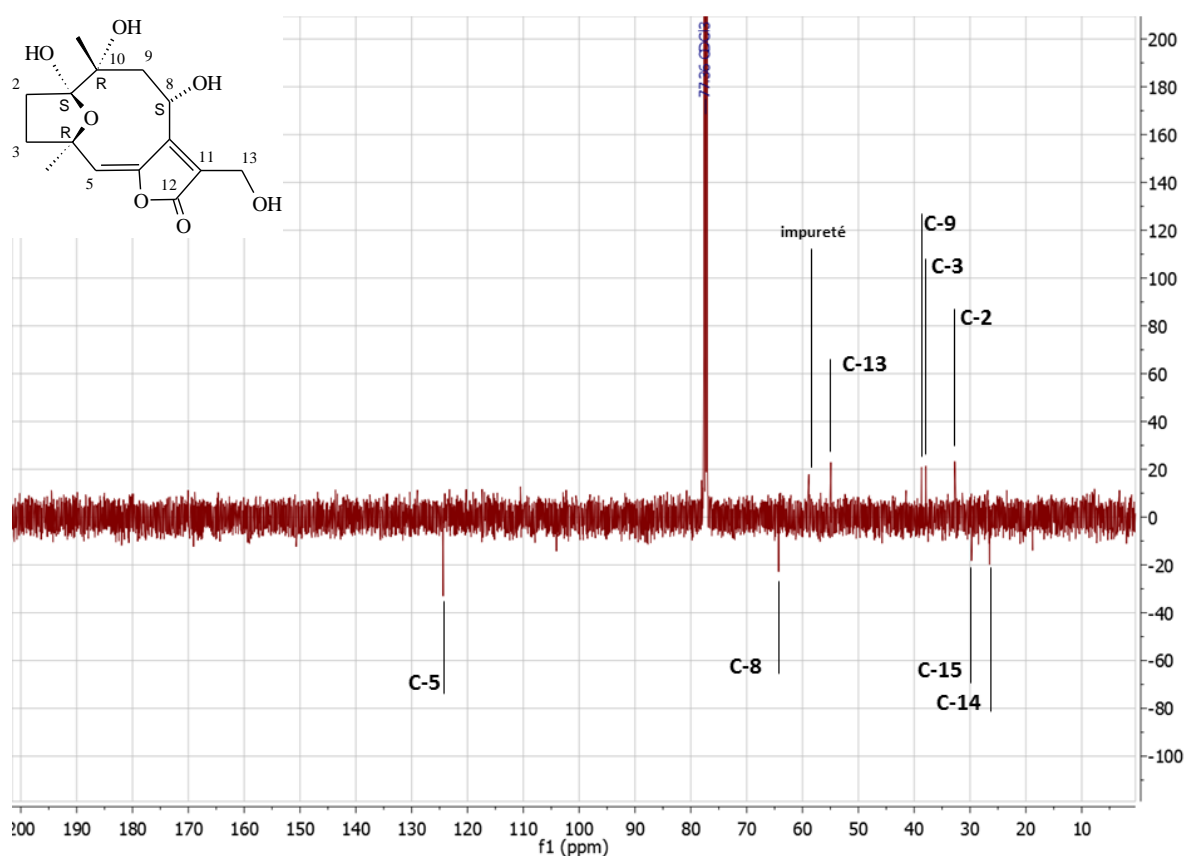


**Figure 91** : Spectre de masse haute résolution du composé **PS17** obtenu en mode ESI positif

#### III. 7.2. Spectrométrie de RMN

Le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  (voir **Figure 92**) enregistré en *J*-modulé dans le  $\text{CDCl}_3$  indique la présence de 8 atomes de carbone sur 15 attendus. Parmi ces signaux, on note la présence de 2 signaux méthyles, 2 signaux de carbones tertiaires et 4 signaux de carbones secondaires.

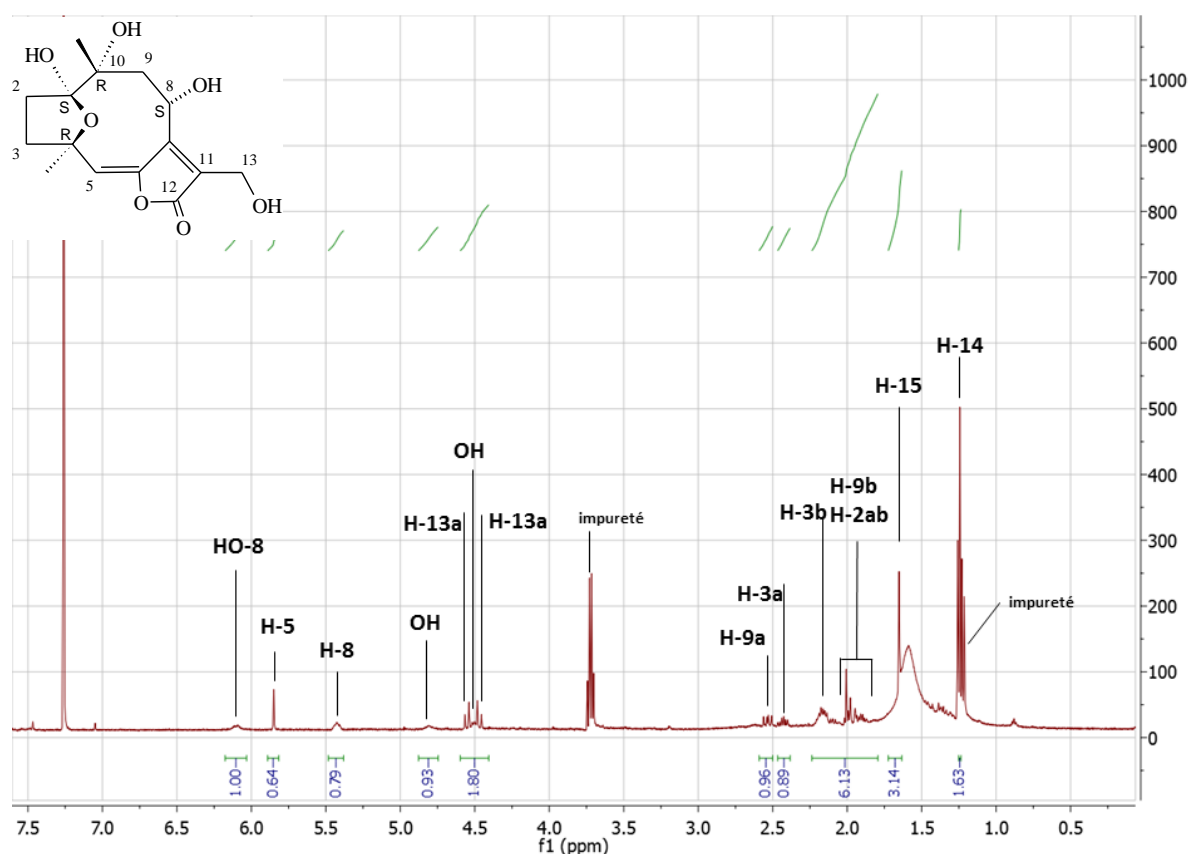




**Figure 92** : Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  en *J*-modulé du composé **PS17**  
(298 K, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

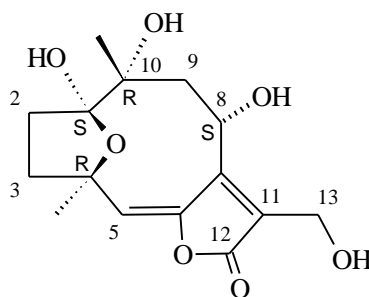
Le spectre  $^1\text{H}$  du composé **PS17** est présenté à la **Figure 93**. L'ensemble des signaux attendus pour le noyau hirsutinolide, décrits au paragraphe III.1.2, sont présents.

- La présence d'un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  6,10 ppm ( $J=12$  Hz), couplant avec H-8, indique la présence d'une fonction hydroxyle en position 8, dont le proton serait engagé dans une liaison hydrogène intramoléculaire.



**Figure 93** : Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé **PS17** (298 K, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

L'analyse des spectres de RMN 2D HSQC, HMBC nous permet d'identifier le composé **PS17** comme étant le piptocarphol (**Figure 94**). Ceci est confirmé par comparaison avec les données de la littérature (Bardón *et al.*, 1993). Aucun numéro CAS ne correspond à la bonne stéréochimie  $1S^*, 4R^*, 8S^*, 10R^*$  pour ce composé, il est cependant généralement enregistré sous le numéro CAS 119089-44-0, de configuration relative  $1R^*, 4S^*, 8R^*, 10R^*$ . Ce composé a précédemment été isolé à partir de plusieurs espèces, notamment de *Chrysolaena verbascifolia* et de *P. spicatus* (Bardón *et al.*, 1993 ; Pollora *et al.*, 2000 ; Issa *et al.*, 2006).



**Figure 94** : Structure du piptocarphol, **PS17**

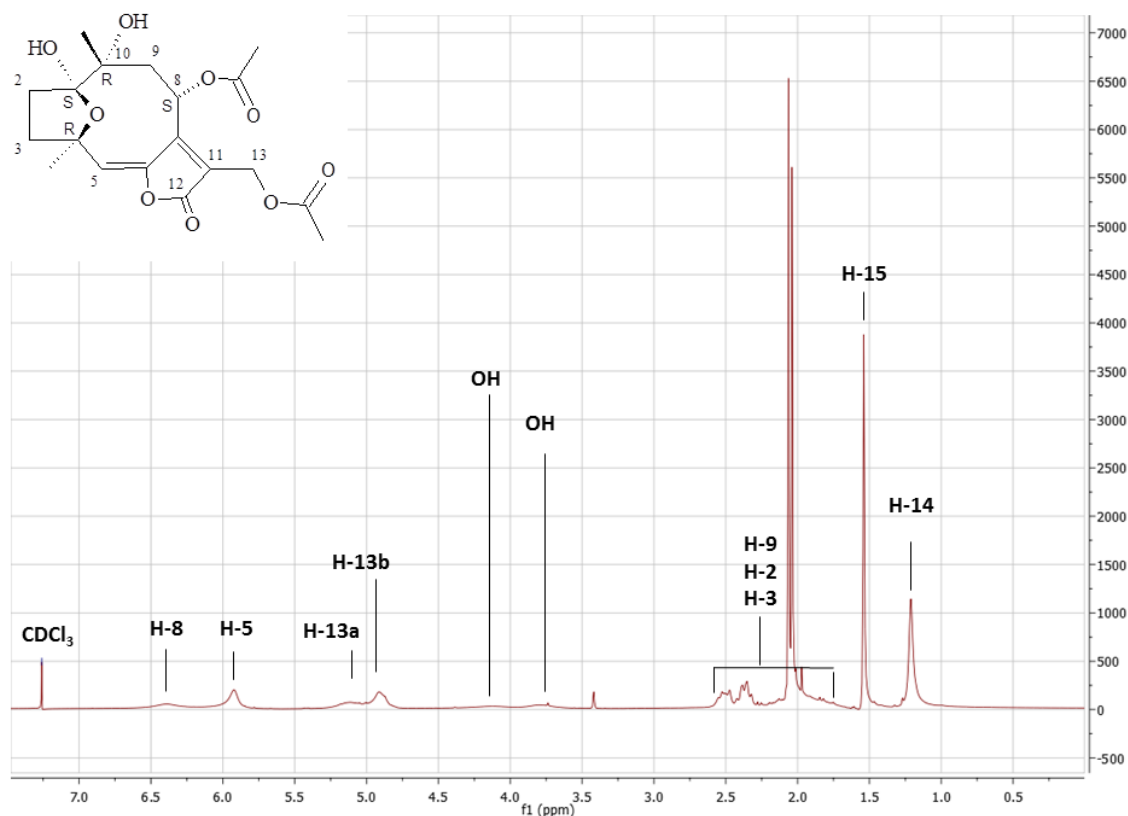
## IV. Discussion sur les données RMN des hirsutinolides

### IV. 1. Optimisation des conditions d'acquisition

#### IV. 1.1. Résolution et élargissement des signaux de RMN $^1\text{H}$

Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  des composés isolés ont été réalisés à température ambiante (298 K soit 25 °C) dans le  $\text{CDCl}_3$  pour une bonne solubilité des molécules et pour permettre de comparer les données obtenues avec celles de la littérature.

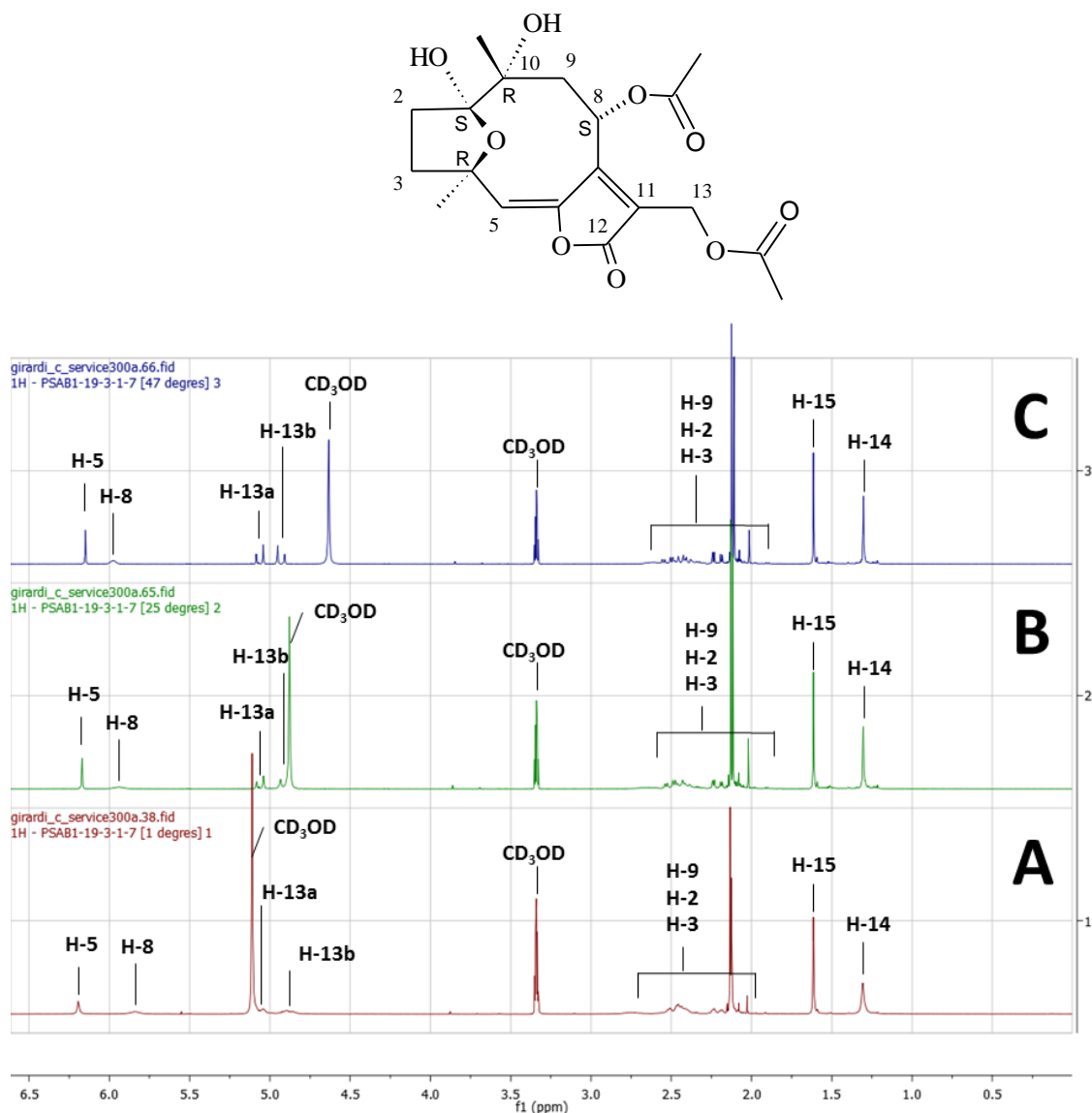
Il est alors apparu que certains des signaux de RMN  $^1\text{H}$  étaient très larges et mal résolus. Deux signaux en particulier sont concernés par ce phénomène, les hydrogènes H-8 et H-5. Dans le cas du spectre de RMN  $^1\text{H}$  de **PS11**, choisi comme exemple (**Figure 95**), c'est aussi le cas des signaux des protons méthyléniques H-13a ( $\delta_{\text{H}} = 5,18$  ppm) et H-13b ( $\delta_{\text{H}} = 4,92$  ppm).



**Figure 95** : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé **PS11** ( $\text{CDCl}_3$ ) obtenu à 298 K (300 MHz)

Ce problème a déjà été décrit dans la littérature pour ce type de composés (Bardón *et al.*, 1992 ; 1993). Il est dû à la flexibilité du macrocycle à 10 carbones du noyau hirsutinolide, impliquant des changements conformationnels constants lors des analyses de RMN. La

finesse et la résolution des signaux protons de ce type de noyau peuvent être améliorées dans certains cas et en partie, en réalisant les analyses à haute température dans le  $C_6D_6$  (Bardón *et al.*, 1992 ; 1993). Nous avons souhaité observer si la réalisation des analyses de RMN dans le  $CD_3OD$ , à différentes températures, permettait d'améliorer les signaux de RMN obtenus pour les hirsutinolides. Cela est illustré à la **Figure 96** pour le composé **PS11**.



**Figure 96** : Spectres de RMN  $^1H$  du composé **PS11** ( $CD_3OD$ , 300 MHz), obtenus à différentes température : 47°C (spectre **C**), 25°C (spectre **B**) et 1°C (spectre **A**)

On note tout d'abord une nette amélioration des signaux H-5 ( $\delta_H = 6,2$  ppm) et H-13ab ( $\delta_H = 5,1$  et  $4,9$  ppm), lorsque les analyses sont réalisées dans le  $CD_3OD$  à 25°C (spectre **B** de la **Figure 96**) par rapport au  $CDCl_3$  à la même température (**Figure 95**). Cela est probablement dû à une meilleure solubilité du composé dans le méthanol deutéré.

On peut également remarquer une « inversion » des déplacements chimiques des hydrogènes H-5 et H-8 dans le CD<sub>3</sub>OD par rapport au CDCl<sub>3</sub> : le signal de H-8 étant à un  $\delta_H$  de 6,4 ppm et celui de H-5 à un  $\delta_H$  de 5,9 ppm dans le CDCl<sub>3</sub>, alors qu'ils sont dans le CD<sub>3</sub>OD à  $\delta_H$  5,9 ppm pour H-8 et  $\delta_H$  6,2 ppm pour H-5.

Le spectre **C (Figure 96)**, obtenu à 47°C, montre une nette amélioration de la résolution de l'ensemble des signaux. Le signal de l'hydrogène H-8 à  $\delta_H$  5,98 ppm demeure cependant large, bien que légèrement plus fin qu'à 25°C.

Le spectre **A**, quant à lui, a été acquis à 1°C. À priori, une température plus basse devrait ralentir les mouvements du macrocycle et figer la molécule dans une conformation donnée. Cependant, il apparaît sur ce spectre que les signaux sont particulièrement larges et non résolus.

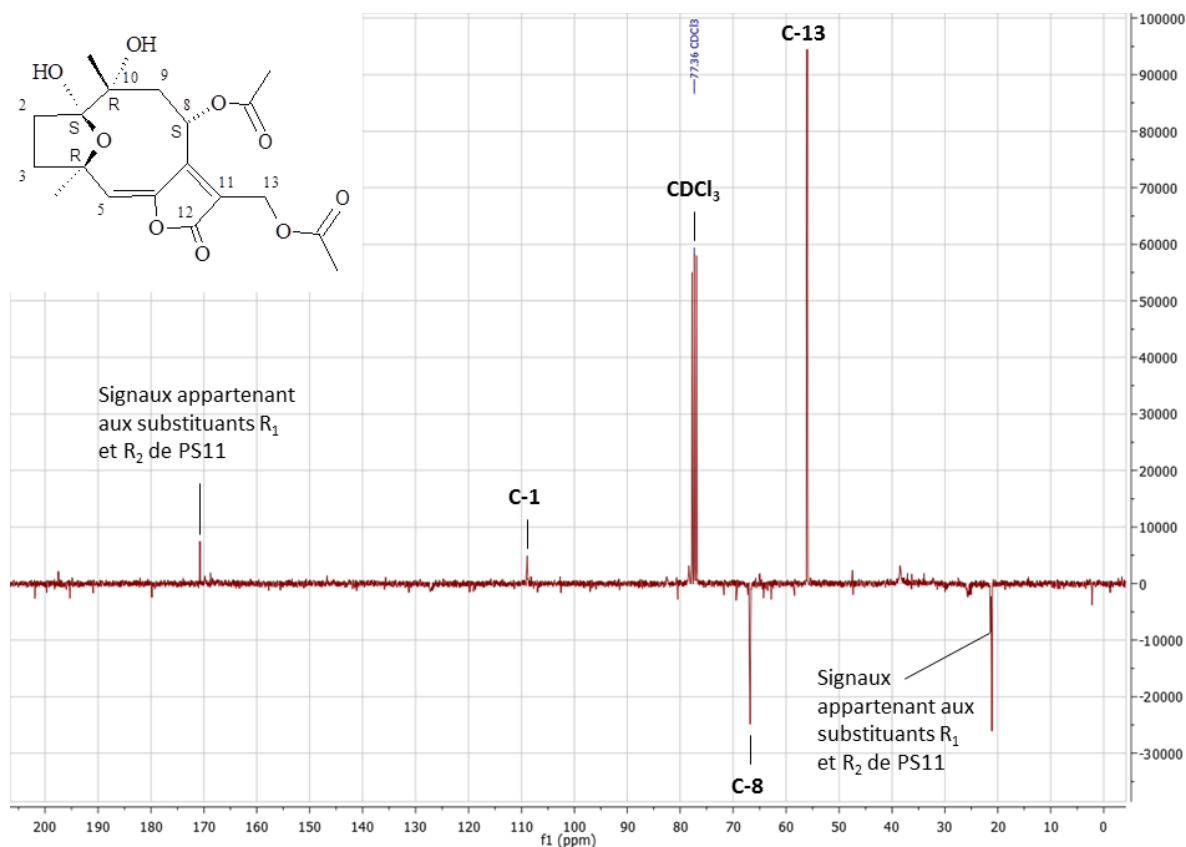
Ces informations sont valables pour les composés estérifiés en position 8 (**PS9**, **PS11**, **PS13** et **PS14**). Si on observe également une amélioration des signaux dans le CD<sub>3</sub>OD pour les composés ayant un hydroxyle libre en position 8 (**PS15**, **PS16** et **PS17**), il est apparu que l'acquisition de leurs spectres de RMN dans ce solvant conduisait à la visualisation de deux formes en équilibre pour chacune des molécules. Ce phénomène particulier sera décrit en détail dans le paragraphe IV.3.

#### IV. 1.2. Signaux de RMN <sup>13</sup>C en *J-modulé* et zgpg30

Les spectres de RMN du <sup>13</sup>C obtenus dans le CDCl<sub>3</sub> donnent peu de renseignements sur la structure de ces molécules.

Tout d'abord, le noyau hirsutinolide présente sept carbones quaternaires. Ces carbones fournissent généralement des signaux d'intensités faibles ou nulles dans des conditions d'enregistrement standard. Par ailleurs, étrangement, certains des signaux carbones attendus n'apparaissent pas toujours pour ces composés, ou bien avec une intensité très faible sur les spectres <sup>13</sup>C obtenus en *J-modulé*. C'est souvent le cas par exemple des carbones des méthyles C-14 et C-15, mais aussi parfois des carbones méthyléniques C-2, C-3 et C-9, ainsi que le C-5 vinylique.

À titre d'exemple la **Figure 97** présente le spectre de RMN <sup>13</sup>C en *J-modulé* enregistré pour le composé **PS11**. On note la présence de seulement 3 signaux carbones sur les 15 attendus pour le noyau hirsutinolide : le carbone quaternaire C-1, le carbone méthylénique C-13, très intense, et le carbone C-8. Les signaux des autres carbones du noyau n'apparaissent pas du tout pour ce composé.

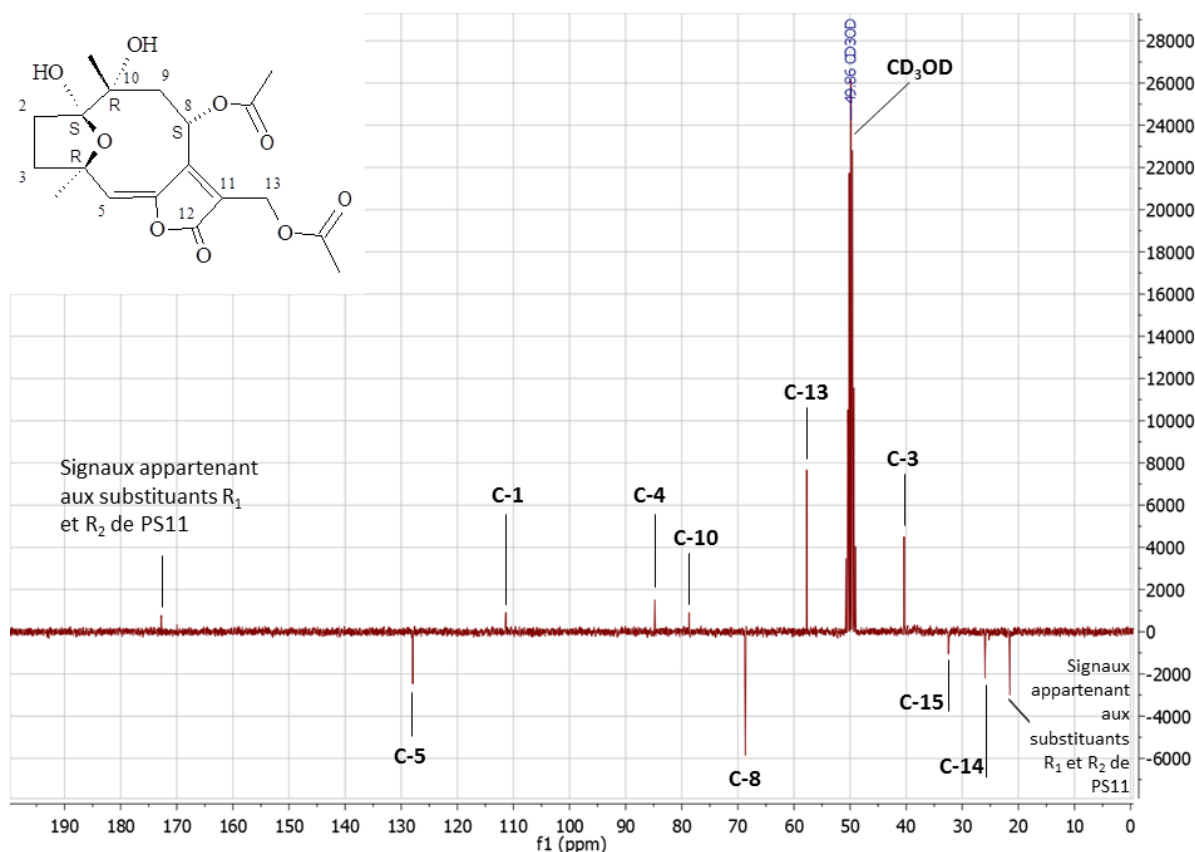


**Figure 97** : Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  en *J*-modulé du composé **PS11** (298 K, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

La réalisation des analyses de RMN du  $^{13}\text{C}$  dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  à haute température apporte une amélioration. Elle permet de visualiser certains des signaux manquants sur les spectres acquis dans le  $\text{CDCl}_3$ .

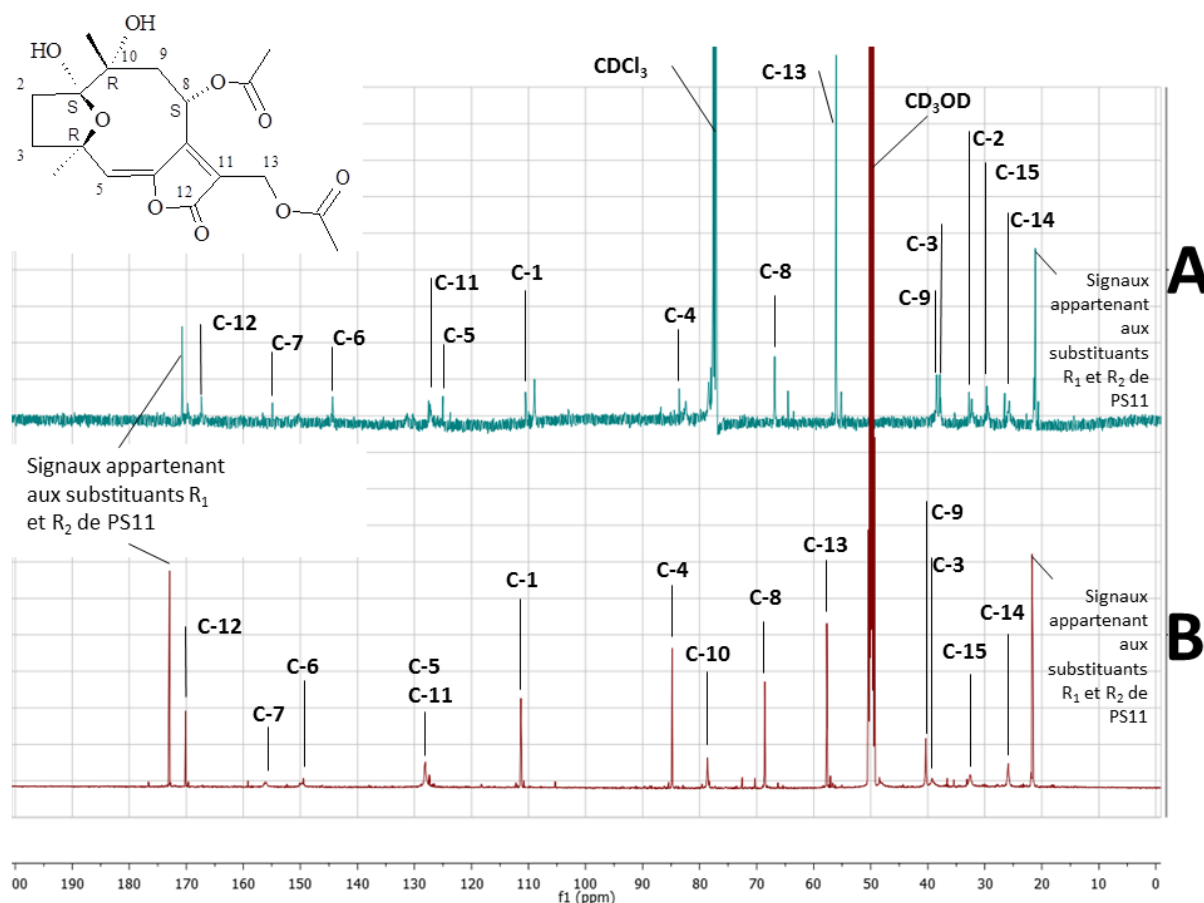
Cela est illustré à la **Figure 98**, représentant le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  réalisé en *J*-modulé (pour le composé **PS11**) dans le méthanol deutéré. On constate que les signaux des méthyles  $\text{CH}_3$ -14 et  $\text{CH}_3$ -15 sont présents, ainsi que le carbone méthylénique C-3, le carbone vinylique C-5 et les carbones quaternaires C-4 et C-10, en plus des signaux déjà présents pour les analyses réalisées dans le chloroforme deutéré. Les carbones méthyléniques C-2 et C-9 ne sont pas visibles dans le cas de ce composé.

Concernant le cas particulier des composés hydroxylés en position 8 (**PS15**, **PS16** et **PS17**), on observe comme pour les spectres  $^1\text{H}$ , un dédoublement des signaux  $^{13}\text{C}$  dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  (voir explications au paragraphe IV.3.).



**Figure 98** : Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  en *J*-modulé du composé **PS11**  
(320 K, 75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Nous avons voulu vérifier l'allure des spectres de RMN du composé **PS11** acquis grâce à une autre expérience de RMN  $^{13}\text{C}$ , l'expérience *zgpg30*, qui est une séquence standard de découplage. Les résultats sont présentés à la **Figure 99** qui compare les spectres obtenus dans le  $\text{CDCl}_3$  et le  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Dans les deux cas, les signaux des carbones secondaires C-9, C-3, C-2, et méthyliques C-14 et C-15 sont peu intenses.



**Figure 99** : Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  du composé **PS11** acquis avec l'expérience zgpg30

**A** : 25 mg/mL, NS : 12 888 scans (298 K, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ; **B** : 25 mg/mL, NS : 30 720 scans, (298 K, 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

En conclusion, on note une amélioration générale des signaux protons et carbones pour les hirsutinolides lorsque les analyses de RMN sont réalisées dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  par rapport au  $\text{CDCl}_3$ . Les molécules présentent les mêmes déplacements chimiques dans les deux solvants, à l'exception des signaux des hydrogènes H-5 et H-8 : le signal de l'hydrogène H-5 devient plus déblindé alors que le signal de l'hydrogène H-8 devient moins déblindé par rapport aux signaux obtenus dans le  $\text{CDCl}_3$ . Dans le cas des composés hydroxylés en position 8, un dédoublement de l'ensemble des signaux est observé dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Le paragraphe IV.3 sera consacré à ce phénomène particulier.

#### IV. 2. Détermination des configurations relatives des hirsutinolides

Les hirsutinolides possèdent dans leur structure 4 carbones chiraux (C-1, C-4, C-8, C-10) dont 3 quaternaires (C-1, C-4 et C-10). Ces carbones appartiennent au macrocycle à 10 carbones et leurs configurations dépendent de la représentation du cycle dans l'espace. Afin d'éviter les confusions, il est important de déterminer leurs configurations relatives.



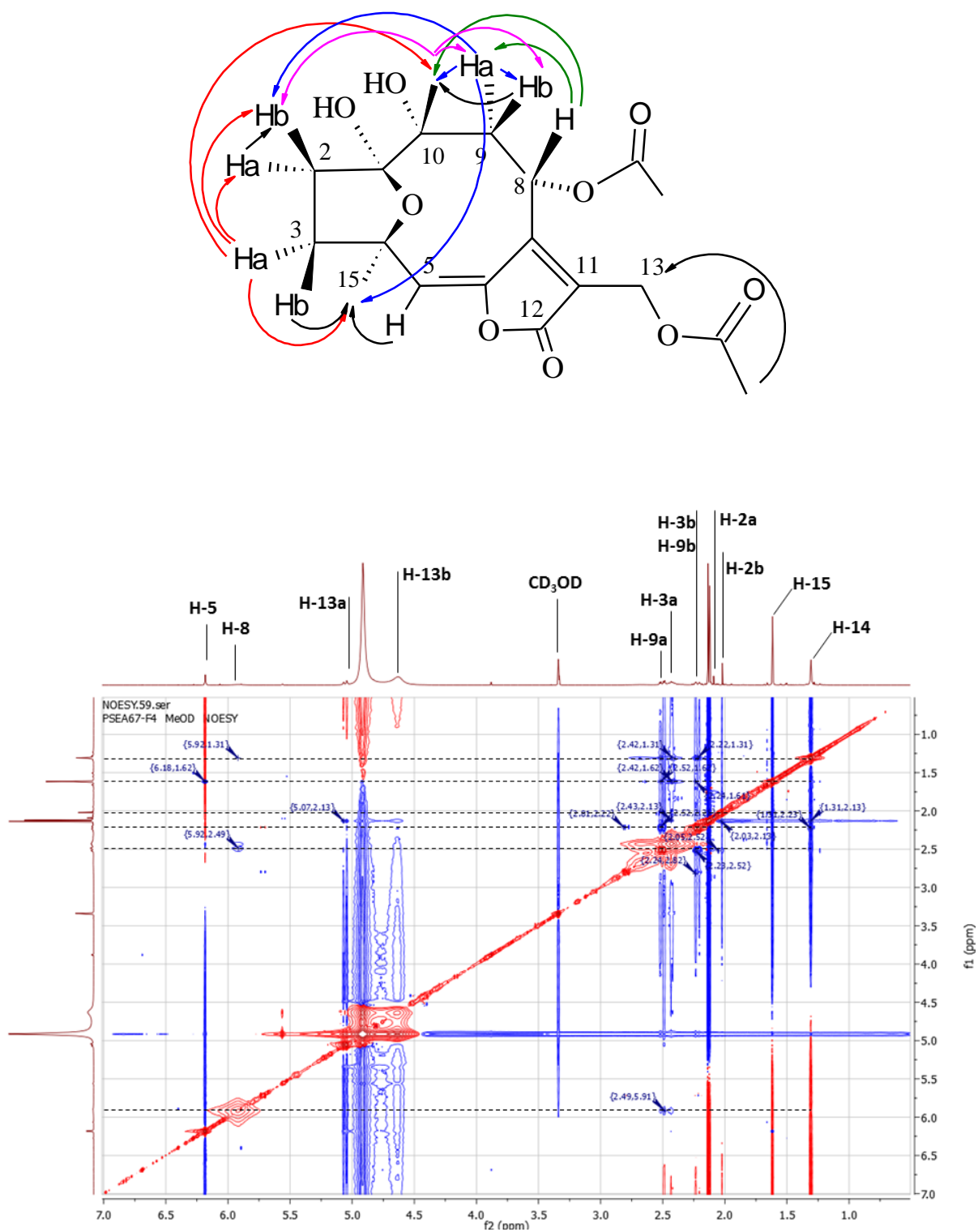
Habituellement, les corrélations NOESY observées en RMN permettent d'établir la stéréochimie des molécules. Dans le cas des hirsutinolides, les corrélations NOE possibles sont réduites du fait d'un grand nombre de carbones quaternaires dans leur structure (au nombre de 7). De plus il apparaît qu'elles ne sont pas discriminatoires, ne permettant pas d'établir la configuration relative de ces positions chirales.

A titre d'illustration, le spectre de 2D NOESY a été réalisé pour le composé **PS11** dans le CD<sub>3</sub>OD (**Figure 100**). Il est à remarquer les nombreuses corrélations non spécifiques entre des hydrogènes de part et d'autre du plan formé par le macrocycle, notamment :

- Une tache de corrélation entre le méthyle H-14 (au dessus du plan) et les hydrogènes H-9a/b, chacun d'un côté du plan du cycle.
- Les corrélations entre les deux hydrogènes en position 3 (de part et d'autre du plan) et le méthyle H-15 (au dessous du plan).
- Une tache de corrélation entre l'hydrogène H-8 $\beta$  et l'hydrogène H-9 $\alpha$ .
- Des taches de corrélation entre l'hydrogène H-3a (orienté en  $\alpha$ ) avec plusieurs hydrogènes situés de part et d'autre du plan.

Le même phénomène est observé lorsque les analyses de RMN de NOESY sont acquises dans le CDCl<sub>3</sub>.

Il apparaît donc que les corrélations obtenues dans le cas de l'expérience de 2D NOESY ne sont pas suffisamment claires pour permettre d'établir la configuration relative des hirsutinolides.



**Figure 100** : Spectre de RMN 2D NOESY du composé **PS11** (CD<sub>3</sub>OD, 298 K, 125 MHz) et corrélations NOESY observées

Ces résultats ne sont pas surprenants étant donnée la distorsion du macrocycle dans l'espace mais surtout sa flexibilité conformationnelle. Il est possible que les corrélations NOESY observées proviennent de différentes conformations des molécules à température ambiante. La réalisation des analyses de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  à haute température permet d'obtenir une « conformation moyenne » des molécules, en induisant des changements conformationnels très rapides. Si elle permet d'améliorer la résolution des spectres de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et de 2D hétéronucléaires, elle ne permet pas de tirer des conclusions acceptables quant à la stéréochimie de ces composés sur la base des corrélations NOE observées, dans ces conditions (Catalán *et al.*, 1988).

La détermination de la configuration relative des hirsutinolides n'est donc pas aisée et a de ce fait été entachée d'erreurs au fil des années, notamment vis-à-vis des configurations relatives de C-8 (Catalán *et al.*, 1988) et C-10 (Cowall *et al.*, 1981 ; Herz et Kulanthaivel, 1983; Jakupovic *et al.*, 1985).

Concernant le carbone C8\*, le signal particulièrement déblindé de l'hydrogène H-8 a été expliqué dans un premier temps par la proximité de l'oxygène porté par la position 8, fréquemment estérifiée (Bohlmann *et al.*, 1978). Cowall et collaborateurs (Cowall *et al.*, 1981) ont ensuite suggéré qu'il était le plus probablement dû à sa position dans le cône de déblindage du tétrahydrofurane, justifiant ainsi, à tort, sa position en dessous du plan du macrocycle, c'est-à-dire avec une orientation  $\alpha$ . Finalement, Jakupovic a proposé qu'il était dû à l'effet de la double liaison en 7-11 après avoir établi la stéréochimie 8S\* du carbone chiral, soit avec l'hydrogène H-8 orienté en  $\beta$ , grâce aux analyses de RX du composé 8 $\alpha$ -angeloyloxyhirsutinolide-13-O-acetate<sup>5</sup> (Catalán *et al.*, 1988 ; Jakupovic *et al.*, 1985). Cette analyse a également permis de déterminer la stéréochimie des autres carbones et notamment du C-10 établi 10R\*.

Par la suite, la structure des hirsutinolides a été établie par comparaison avec les déplacements chimiques et les constantes de couplages des molécules publiées dans la littérature. Néanmoins, elle a de nouveau posé problème lorsque de nouveaux hirsutinolides ont été isolés, avec des déplacements chimiques et/ou des constantes de couplages ne correspondant pas aux valeurs publiées.

C'est ainsi, par exemple, que Bardón et collègues ont émis l'hypothèse de deux groupes d'hirsutinolides, basés sur des différences concernant le déplacement chimique de H-8 et les constantes de couplages observées entre  $J_{\text{H-8,H-9a}}$  et  $J_{\text{H-8,H-9b}}$  (Bardón *et al.*, 1988). Ces auteurs ont observé la présence de deux types de composés décrits dans la littérature : les composés du groupe A avec des constantes de couplages  $J_{\text{H-8,H-9a}}$  (8-11 Hz) et  $J_{\text{H-8,H-9b}}$  (1-3 Hz) très différentes et les composés du groupe B avec des constantes de couplages égales et relativement faible (~3 Hz). Etant donné que les composés du groupe A présentent une stéréochimie 1S\* établie grâce aux analyses de rayons X (Catalán *et al.*, 1988 ; Jakupovic *et al.*, 1985), Bardón a proposé une épimérisation en C-1 comme hypothèse la plus probable

---

<sup>5</sup> Les analyses RX ont pu être réalisées sur le 8 $\alpha$ -angeloyloxyhirsutinolide 13-O-acetate, référencé **8b** dans la publication de Jakupovic *et al.* (1985) et **7b** dans la publication de Catalán *et al.* (1988)

pour expliquer les constantes de couplages  $J_{H-8,H-9a}$  et  $J_{H-8,H-9b}$  similaires obtenues pour les composés du groupe B. Leur configuration serait donc  $1R^*$ . A ce jour, il n'existe pas dans la littérature de références indiquant si cette hypothèse a pu être validée, expérimentalement. Dans un autre cas, les auteurs ont observé des déplacements chimiques ne correspondant à aucun des deux groupes proposés par Bardón (Pollora *et al.*, 2000). Ils ont alors proposé une isomérisation en C-10 sans pouvoir prouver leur hypothèse du fait de la dégradation des composés au cours des analyses<sup>6</sup>. Cela traduit la difficulté rencontrée dans la détermination des configurations relatives des hirsutinolides.

Nous avons montré que les analyses de RMN 2D NOESY ne permettaient pas d'établir la stéréochimie des molécules isolées dans ce travail. Néanmoins, il existe plusieurs références dans la littérature pour lesquelles les auteurs se sont basés sur ces expériences pour établir la stéréochimie d'hirsutinolides présentant le même noyau structural (Kos *et al.*, 2006) ou des hirsutinolides de structures proches (Youn *et al.*, 2012 ; 2014; Kuo *et al.*, 2003).

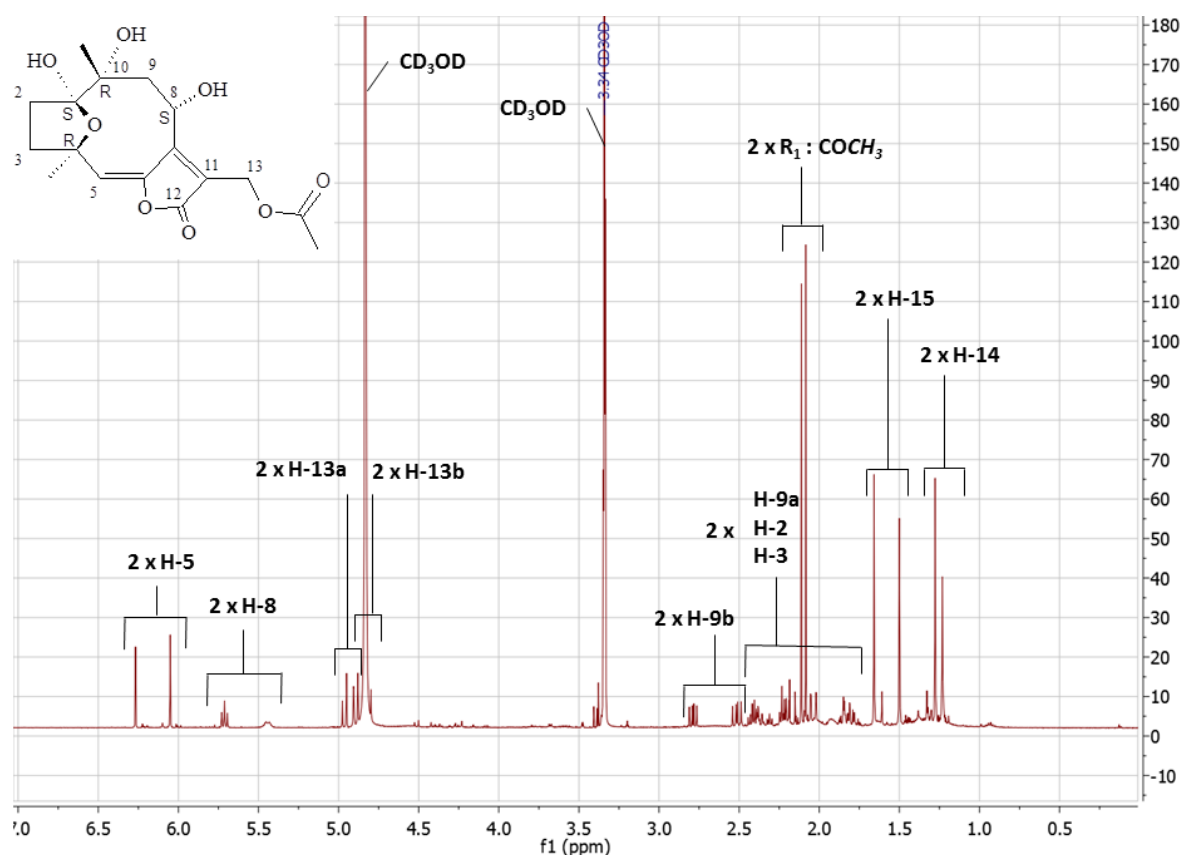
Dans le travail présenté, la configuration relative des composés a été déterminée par comparaison avec les données de RMN de la littérature obtenues dans le  $CDCl_3$ , c'est-à-dire les déplacements chimiques  $^1H$  et  $^{13}C$  ainsi que les valeurs des constantes de couplages  $J$  observées. L'ensemble des composés isolés possède la stéréochimie suivante  $1S^*$ ,  $4R^*$ ,  $8S^*$ ,  $10R^*$  (Catalán *et al.*, 1988).

#### IV. 3. Détermination des conformations

Dans le cas des molécules présentant un hydroxyle libre en C-8 (**PS15**, **PS16** et **PS17**), les spectres de RMN  $^1H$  acquis dans  $CD_3OD$  ont la particularité de présenter des signaux dédoublés correspondant à deux formes différentes de la molécule. Pourtant, une seule forme persiste dans le  $CDCl_3$  pour ces trois composés, correspondant à la structure décrite, pour chacun d'eux, dans la littérature. À titre d'exemple, le spectre de RMN  $^1H$  du composé **PS15** obtenu dans le  $CD_3OD$  est présenté à la **Figure 101**. On note pour chaque signal  $^1H$  la présence de 2 pics d'intensités non équivalentes, présentant des déplacements chimiques et une multiplicité différents.

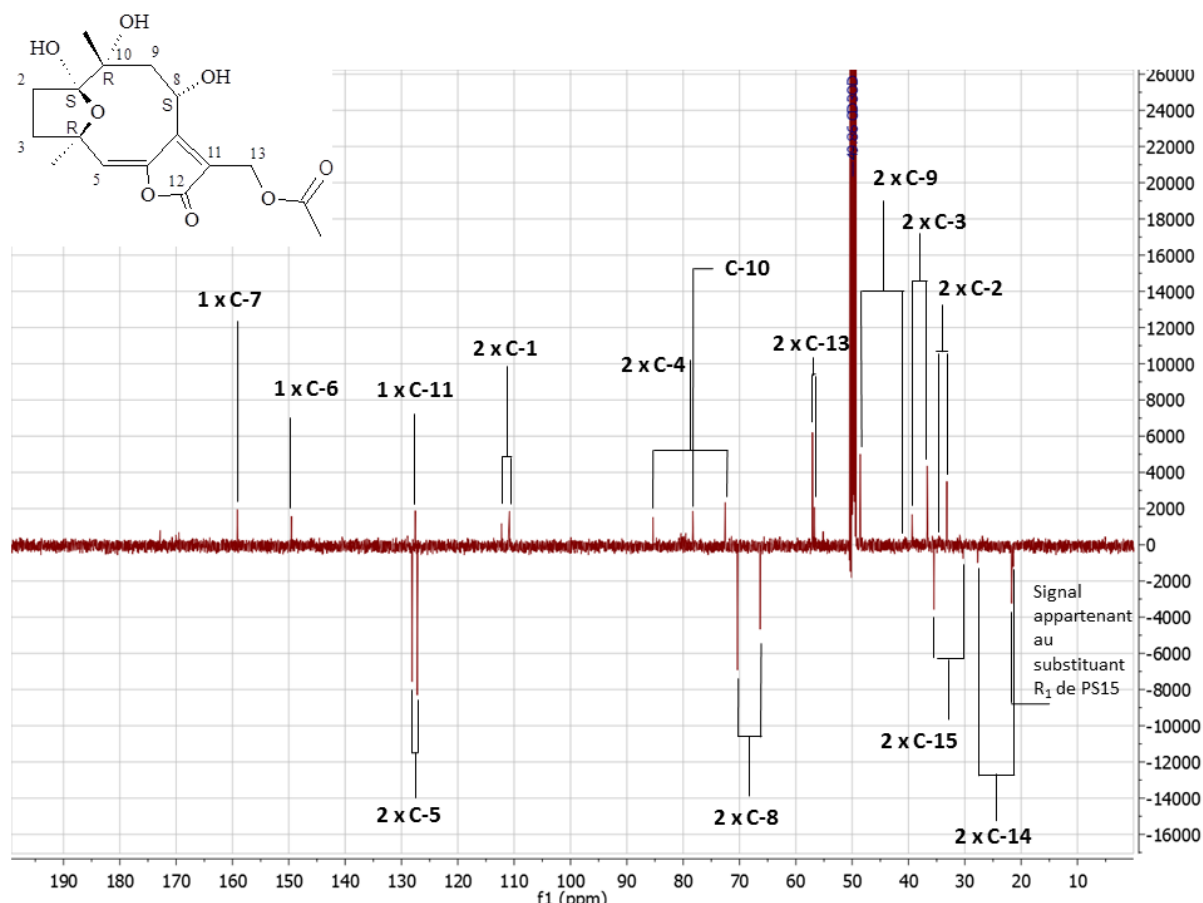
---

<sup>6</sup> Composés référencés **4a** et **4b** par Pollora *et al.* (2000)



**Figure 101** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **PS15** obtenu dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  (304 K, 500 MHz)

De même, Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  réalisés en *J-modulé* acquis dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  présentent également des signaux dédoublés. À titre d'exemple, le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **PS15** obtenu dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  est présenté à la **Figure 102**. On note que la plupart des signaux sont dédoublés, bien que certains signaux aient une intensité très faible ou bien n'apparaissent pas sur les spectres, comme cela a déjà été signalé au chapitre IV.1.2.



**Figure 102** : Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **PS15** obtenu dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  (304 K, 125 MHz)

Les corrélations observées sur les spectres de RMN à deux dimensions HSQC et HMBC permettent de mettre en évidence que ces signaux correspondent, à chaque fois, à deux formes différentes de la même structure générale du composé. Cela est le cas pour les trois composés concernés: **PS15**, **PS16**, **PS17**. Dans le cas des trois hirsutinolides, les deux formes ont été d'abord nommées arbitrairement A et B, précédées du nom du composé, tel que **PS15A** et **PS15B**. Ces deux formes A et B obtenues dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  présentent des données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  différentes. En comparant les données obtenues pour les deux formes, entre les trois composés, des similitudes sont apparues. Il est notamment apparu que l'une des formes présente, pour chacune de molécule, dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ , des déplacements chimiques et des constantes de couplages proches de la forme unique présente dans le  $\text{CDCl}_3$  (**Tableau 12** et **Tableau 14**). Par facilité, elle a été désignée comme correspondant à la forme B pour chacun des trois composés.

Cette observation a ainsi permis de déterminer des déplacements chimiques  $\delta_{\text{H}}$  moyens ainsi que les constantes de couplages moyennes enregistrés pour chacune des formes et de les comparer avec les données de RMN  $^1\text{H}$  moyennes obtenues dans le  $\text{CDCl}_3$ . Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 12**.

**Tableau 12** : Déplacements chimiques moyens  $\delta_H$  observés pour les deux formes A et B des composés **PS15**, **PS16** et **PS17**, dans  $CD_3OD$ , comparés aux  $\delta_H$  moyens obtenus dans  $CDCl_3$ 

	Forme A, $CD_3OD$ (304 K, 500 MHz)	Forme B, $CD_3OD$ (304 K, 500 MHz)	$CDCl_3$ (298 K, 500 MHz)
Position	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_H$ (J in Hz)
2a	~ 1,8, m. br.	~ 2,0, m. br.	~ 1,9-2,0, m.
2b	~ 1,8, m. br	~ 1,9, m. br.	
3a	~ 2,3, m.	~ 2,4, m.	~ 2,4, m.
3b	~ 1,8, m. br.	~ 2,2, m. br	~ 2,2, m.
5	~ 6,2, s.	~ 6,0, s.	~ 5,9, s.
8	~ 5,7, dd. (9, 8)	~ 5,4, d., $J=11$	~ 5,5, dd. (12, 11) ou ddd. (12, 11, 2)
9a	~ 2,8, dd. (14, 9)	~ 2,5, dd. (16, 11)	~ 2,5, dd. (16, 11)
9b	~ 2,2, m.	~ 2,0, m.	~ 2,0, m.
13a	4,2 à 4,9 (selon $R_1$ ), d., $J=13$	4,3 à 4,9 (selon $R_1$ ), d., $J=13$	4,3 à 4,9 (selon $R_1$ ), d., $J=13$
13b			
14	~ 1,3, s.	~ 1,2, s.	~ 1,2, s.
15	~ 1,5, s.	~ 1,7, s.	~ 1,7, s.
OH	-	-	~ 3,8, br.
OH	-	-	~ 4,1, br.
8-OH	-	-	~ 6,1, d. $J=12.0$

En intégrant les signaux obtenus en RMN  $^1H$  pour les deux formes A et B, pour chacun des composés, on peut établir leurs pourcentages au sein du mélange (**Tableau 13**). La forme A est majoritaire pour les composés **PS16** et **PS17**.

**Tableau 13** : Proportions des deux formes A et B (en %) établies d'après la moyenne des aires des signaux  $^1H$  obtenus dans  $CD_3OD$ 

Composés	Forme A	Forme B
<b>PS15</b>	48%	52%
<b>PS16</b>	53%	47%
<b>PS17</b>	58%	42%

Le **Tableau 14** présente les déplacements chimiques  $\delta_C$  observés pour les 2 formes en comparaison avec les données obtenues dans le  $CDCl_3$ . De nouveau, il apparaît que la forme B, présente dans le  $CD_3OD$ , a des déplacements chimiques proches de la forme unique présente dans le  $CDCl_3$ . Cela est particulièrement remarquable pour les positions 4, 9, 14 et 15.

**Tableau 14** : Déplacements chimiques moyens  $\delta_C$  observés pour les deux formes A et B des composés du **PS15**, **PS16** et **PS17**, dans  $CD_3OD$ , comparés aux  $\delta_C$  moyens obtenus dans  $CDCl_3$ .

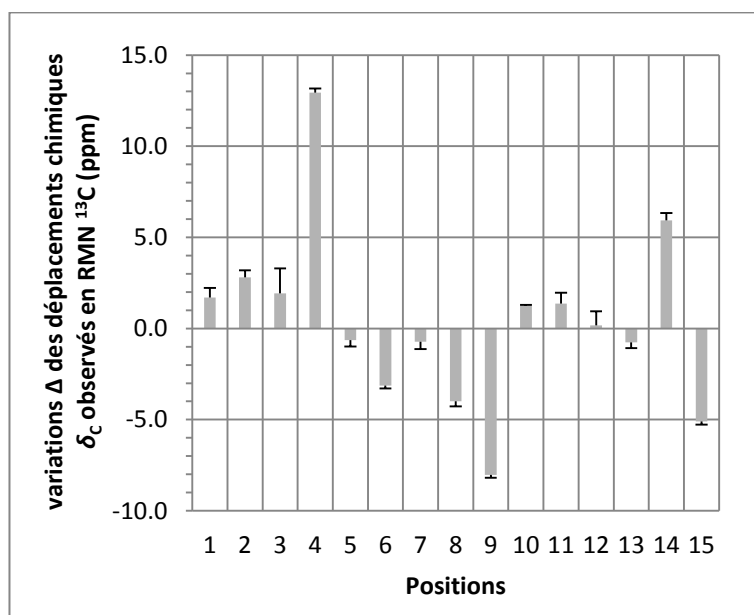
	Forme A, $CD_3OD$ (304 K, 125 MHz)	Forme B, $CD_3OD$ (304 K, 125 MHz)	$CDCl_3$ (298 K, 500 MHz)
Position	$\delta_C$	$\delta_C$	$\delta_C$
1	109-110	110-112	~ 110
2	31-33	34-35	~ 32
3	34-36	37-39	38
4	70-72	83-85	83-84
5	~126	125-126	123-125
6	147-149	144-146	144-145
7	157-158	156-157	152-155
8	68-70	64-66	~ 64
9	40-48	38-41	~ 38
10	76-78	77-79	77-78
11	125-131	127-133	127-131
12	167-170	168-170	167-168
13	55-63	54-63	55-62
14	~21	27-28	~26
15	33-35	28-30	~ 29

Finalement, la **Figure 103** présente les variations moyennes des déplacements chimiques  $\delta_C$  obtenus pour les 3 composés (**PS15**, **PS16** et **PS17**), pour la forme B par rapport à la forme A. Il est à remarquer :

- Un déblindage important de près de 13 ppm du déplacement chimique de la position 4.
- Le blindage de près de 5 ppm du déplacement chimique du carbone méthylique C-15 porté par le carbone 4.
- Un blindage de l'ordre de 8 ppm pour la position 9.



- Enfin, un déblindage de 6 ppm du carbone 14 alors que la position C-10 portant ce méthyle subit peu de changements.



**Figure 103 :** Variations moyennes des déplacements chimiques  $\delta_C$  du noyau hirsutinolide, obtenues pour la forme B par rapport à la forme A.

Ce phénomène de dédoublement des signaux n'apparaît que pour les composés présentant un hydroxyle libre en position 8, suggérant que cette fonctionnalisation joue un rôle essentiel. Lorsque les analyses sont de nouveau réalisées dans le  $\text{CDCl}_3$  pour ces composés, une seule forme persiste. Étant donné la réversibilité de la réaction, il semblerait qu'il s'agisse de deux conformères. Notre hypothèse est que les deux formes observées dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  proviennent de la rupture partielle d'une liaison hydrogène intramoléculaire, présente pour ces molécules dans le  $\text{CDCl}_3$ . Les éléments en accord avec cette hypothèse sont décrits par la suite.

Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  enregistrés dans  $\text{CDCl}_3$  présentent une seule forme. Sur ces spectres, il est à noter la présence d'un doublet proche de  $\delta_{\text{H}}$  6,12 ppm ayant une constante de couplage  $J = 12$  Hz. Ce signal correspond à l'hydrogène non échangeable de la fonction hydroxyle HO-8. Il couple avec H-8 ( $J_{\text{HO-8/H-8}} = 12$  Hz), dont le déplacement chimique  $\delta_{\text{H}}$  est compris entre 5,42 et 5,45 ppm. Le signal du proton H-8 apparaît donc dans le cas de ces composés comme un ddd ( $J_{\text{H-8/H-9a}} = 11$  Hz,  $J_{\text{H-8/H-9b}} = 2$  Hz,  $J_{\text{H-8/HO-8}} = 12$  Hz), ou un doublet de doublet ( $J_{\text{H-8/H-9a}} = 11$  Hz,  $J_{\text{H-8/HO-8}} = 12$  Hz) étant donné la faible valeur de la constante de couplage  $J_{\text{H-8/H-9b}}$ .

La constante de couplage  $J_{\text{H-8/HO-8}}$  de 12 Hz observée est particulièrement importante pour les composés hydroxylés en position 8. Cela suggère la non mobilité du proton OH-8, qui doit donc être maintenu dans une position définie par la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire.

Certain auteurs ont déjà proposé la présence d'une telle liaison au sein d'un hirsutinolide hydroxylé en C-8, en se basant sur la même observation (Yang *et al.*, 2007). Ils ont émis l'hypothèse que la liaison intervienne entre l'oxygène du pont éther-oxyde et l'hydroxyle en position 8. Cependant, il semblerait que Yang et collègues aient fait une erreur quant à la stéréochimie de la position C-10 du spicatolide D pour laquelle ils observent cette liaison hydrogène intramoléculaire. En effet, l'orientation de l'hydroxyle en C-10 est décrite en  $\beta$  pour les trois hirsutinolides isolés dans la publication (Yang *et al.*, 2007), y compris pour la piptocarphine D (composé **PS15**) (Catalán *et al.*, 1988) et le 8 $\alpha$ -acetoxy-10*R*-hydroxy-13-O-methylhirsutinolide (Jakupovic *et al.*, 1985). Il est pourtant établi que ces deux molécules sont de stéréochimie 1*S*\*, 4*R*\*, 8*S*\*, 10*R*\*, soit avec un hydroxyle-10 orienté  $\alpha$  (Catalán *et al.*, 1988 ; Jakupovic *et al.*, 1985). Afin de s'assurer de cette possibilité pour les molécules isolées dans ce travail, la structure en 3D du composé **PS15** a été représentée après minimisation (programme MM2) avec le logiciel Chem3D (**Figure 104**). Il apparaît très clairement que l'hydrogène de HO-8 est suffisamment proche du pont éther-oxyde ( $d=1,871$  Å) pour permettre l'établissement d'une liaison hydrogène.

En s'intéressant aux données de RMN publiées pour d'autres hirsutinolides hydroxylés en position 8, il est apparu qu'un seul conformère était décrit dans le CD<sub>3</sub>OD pour des composés similaires, mais ne présentant pas de fonction hydroxyle en C-10<sup>7</sup> (Youn *et al.*, 2012). L'un de ces hirsutinolides<sup>8</sup>, isolé par Borkosky et collègues (Borkosky *et al.*, 1997), est structurellement proche de **PS15** (structures à la **Figure 104**). Pour ce composé, les auteurs ont décrit pour le signal RMN du proton H-8, obtenu dans le CDCl<sub>3</sub>, un doublet de doublet ( $J_{H-8/H-9b}=6$  Hz et  $J_{H-8/H-9a}=2$  Hz) indiquant l'absence de liaison hydrogène intramoléculaire. La structure en 3D de ce composé, représentée à la **Figure 104**, suggère pourtant que le HO-8 et le pont éther-oxyde sont suffisamment proches pour permettre cette liaison, comme dans le cas de **PS15**.

Deux hypothèses sont possibles. Dans la première hypothèse, la liaison H n'intervient effectivement pas dans le CDCl<sub>3</sub> pour les hirsutinolides non hydroxylés en position C-10. La non-substitution de cette position avec un groupement oxygéné a été associée à une orientation différente du méthyle C-14<sup>9</sup> (Jakupovic *et al.*, 1985). Il est donc possible que l'orientation du méthyle en  $\alpha$  conduise à une conformation du macrocycle défavorisant la formation de la liaison hydrogène intramoléculaire. Il faudrait réaliser des analyses de simulations computationnelles plus poussées et notamment de minimisation des énergies, afin d'étudier ce cas. L'autre hypothèse est que cette liaison est bien présente, mais n'est pas rompue dans le CD<sub>3</sub>OD, puisque Youn et collègues n'observent qu'un seul conformère lors des analyses de RMN de ce type de composés, acquises dans le CD<sub>3</sub>OD (Youn *et al.*, 2012).

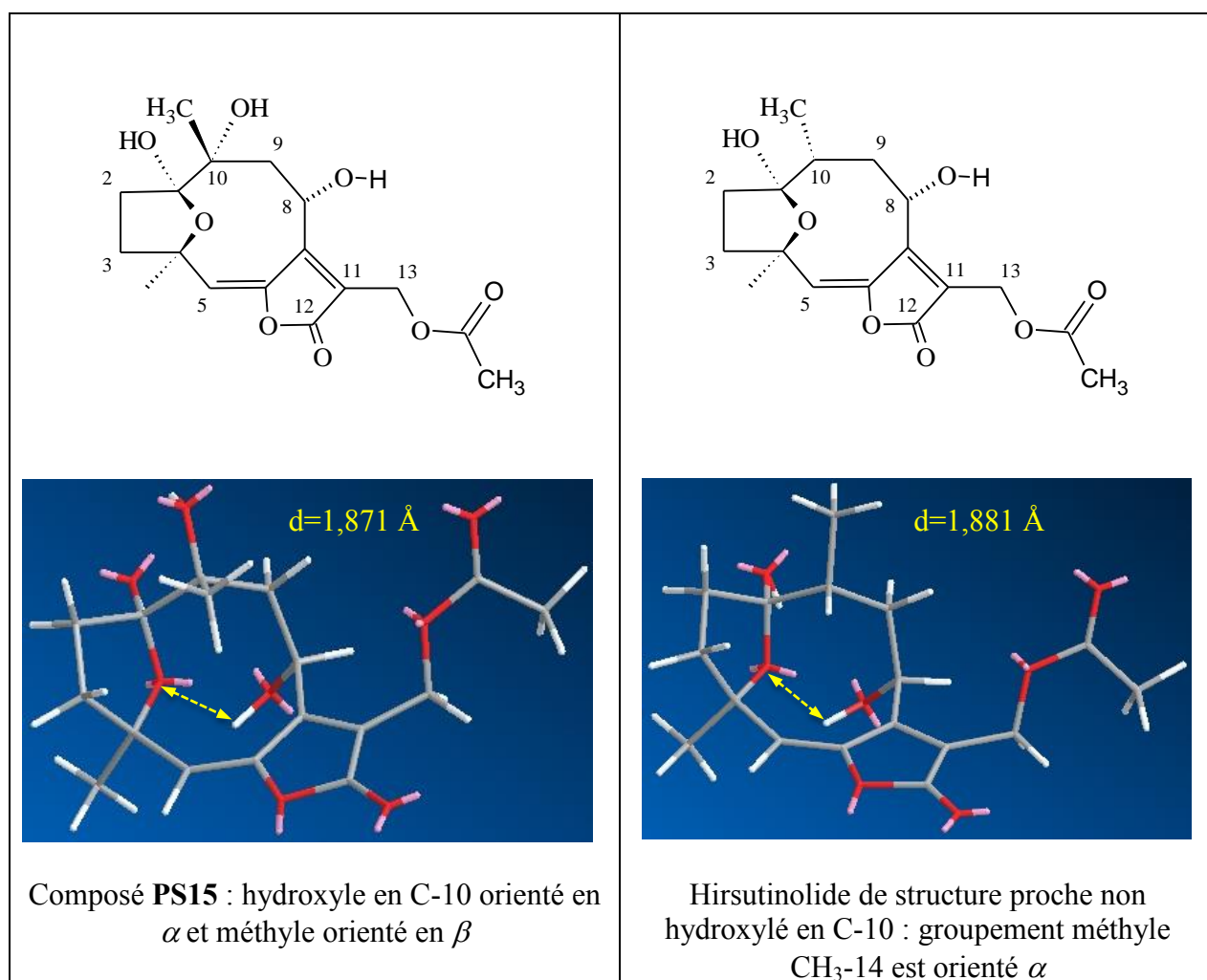
---

<sup>7</sup> Composés référencés **2** et **3** dans la publication de Youn *et al.* (2012), dont les analyses de RMN ont été acquises dans le CD<sub>3</sub>OD.

<sup>8</sup> Composé référencé **7f** dans la publication de Borkosky *et al.* (1997), dont les analyses de RMN ont été acquises dans le CDCl<sub>3</sub>.

<sup>9</sup> La présence d'une fonction hydroxyle en C-10 est associée à une orientation en  $\beta$  du méthyle porté par cette même position. Le méthyle est orienté en  $\alpha$  en l'absence d'un autre substituant oxygéné, d'après Jakupovic *et al.*, 1985. Les auteurs n'ont pas exprimé d'hypothèses concernant ce phénomène mais ont constaté ce fait.

En conclusion, l'hypothèse pouvant expliquer le dédoublement de l'ensemble des signaux de RMN obtenus pour les composés **PS15**, **PS16** et **PS17** est une rupture partielle d'une liaison hydrogène dans le CD<sub>3</sub>OD, solvant polaire et protique, conduisant à un mélange de deux conformères. Les déplacements chimiques de la forme B proches de ceux observés dans le CDCl<sub>3</sub> sont en accord avec la théorie d'une rupture partielle. Cette liaison intervient le plus probablement entre HO-8 et l'oxygène du pont éther-oxyde entre C-1 et C-4. L'hydroxylation de la position 10 semble liée à l'apparition de ce phénomène, même si son influence reste encore à préciser. La réalisation d'analyses de simulations computationnelles plus poussées seraient nécessaire pour comprendre le comportement de ces molécules dans les différents solvants deutérés. La connaissance de ce phénomène de dédoublement des signaux de RMN est primordiale pour la compréhension du comportement des hirsutinolides dans le CD<sub>3</sub>OD, mais aussi en HPLC (V.2.1).



**Figure 104** : Structures du composé **PS15** (en haut à gauche) et de l'hirsutinolide de structure proche isolé par Borkosky *et al.* (1997) (en haut à droite) et leurs représentations 3D respectives (en bas, à gauche et à droite) (Crédit image : ChemDraw®.)

## IV. 4. Discussion

L'élucidation structurale des hirsutinolides par RMN est un processus long et difficile, qui constitue un casse-tête pour les chercheurs travaillant dans ce domaine. La difficulté se trouve tant dans l'élucidation structurale elle-même que dans la recherche et l'analyse des différentes données bibliographiques.

En effet, la flexibilité du cyclodécène et la présence de quatre carbones quaternaires chiraux au sein du macrocycle a généré, dans la littérature, diverses représentations dans le plan de lactones sesquiterpéniques de type germacrane conduisant à des confusions concernant leur stéréochimie (Catalán *et al.*, 1988). Malheureusement, ce problème de représentation apparaît encore dans des publications récentes (Chea *et al.*, 2006 ; Odonne *et al.*, 2011 ; Yang *et al.*, 2007). Ce dernier peut être résolu par les auteurs en appliquant rigoureusement les conventions de représentation publiées par Rogers *et al.*, pour les sesquiterpènes du groupe des germacranolides, et en prenant soin de spécifier la stéréochimie relative des composés (Rogers *et al.*, 1972).

De plus, la flexibilité du cycle à 10 carbones donne lieu à des signaux de RMN  $^1\text{H}$  élargis et donc peu résolus ainsi que des signaux  $^{13}\text{C}$  obtenus en *J-modulé* peu intenses ou absents. Cela nécessite la réalisation des analyses à haute température, comme cela a déjà été signalé (Bardón *et al.*, 1992 ; 1993). Même ainsi, la qualité des signaux reste souvent insuffisante rendant l'élucidation structurale compliquée. Nous avons vu également que ces éléments et la nécessité de réaliser les analyses de RMN à haute température ne permettent pas de tirer des conclusions acceptables sur la base des corrélations NOE concernant la stéréochimie de ces composés, comme cela avait d'ailleurs été déjà constaté auparavant (Catalán *et al.*, 1988). La stéréochimie a de ce fait été l'objet d'erreurs au fil des années (Cowall *et al.*, 1981 ; Herz et Kulanthaivel, 1983 ; Jakupovic *et al.*, 1985), partiellement résolues grâce à la réalisation d'analyses par Rayons X<sup>10</sup> (Catalán *et al.*, 1988 ; Jakupovic *et al.*, 1985).

Malgré cela, un certain nombre d'incertitudes persistent encore concernant la stéréochimie de certains hirsutinolides publiés, notamment les composés du groupe B décrit par Bardón *et al.* (Bardón *et al.*, 1988) ou bien certaines molécules<sup>11</sup> décrites par Pollora *et al.* (Pollora *et al.*, 2000). La structure des molécules est souvent établie par comparaison des déplacements chimiques et des constantes de couplages des molécules publiées précédemment. Un certain nombre d'articles récents s'appuient pourtant sur les corrélations NOE observés afin d'établir la structure des composés alors que nous avons pu constater, dans le cas de nos molécules, que ces corrélations ne donnaient pas d'informations fiables.

Enfin certains auteurs proposent des configurations alternatives sans explications ni démonstrations. Issa *et al.* décrivent notamment l'isolement du piptocarphol (**PS17**) sous forme de deux isomères en C-8 alors que la stéréochimie du carbone 8 est généralement accepté comme 8*S*\* pour les hirsutinolides (Jakupovic *et al.*, 1985 ; Catalán *et al.*, 1988).

<sup>10</sup> Les analyses RX ont pu être réalisées sur le 8*α*-angeloyloxyhirsutinolide 13-O-acetate, référencé **8b** dans la publication de Jakupovic *et al.* (1985) et **7b** dans la publication de Catalán *et al.* (1988)

<sup>11</sup> Composés référencés **4a** et **4b** par Pollora *et al.* (2000)

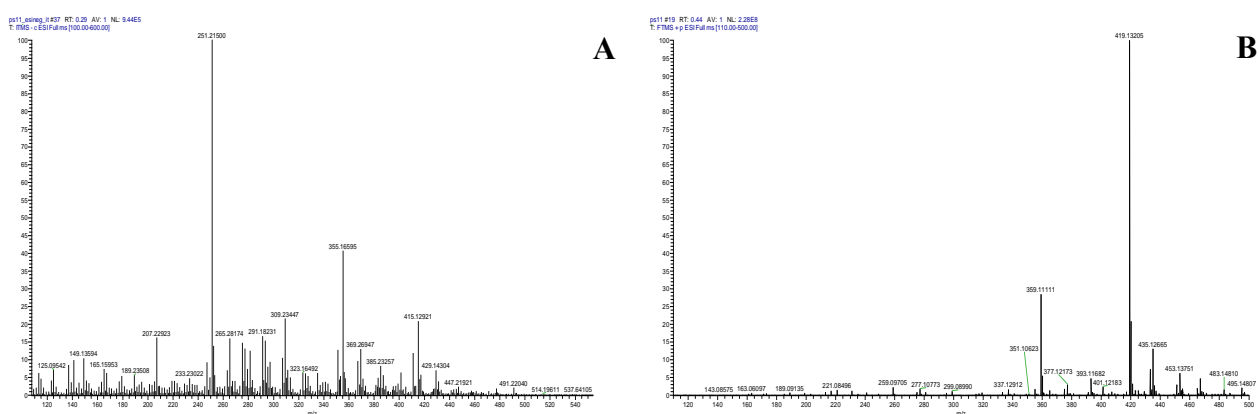
Nous avons montré que les composés isolés ayant une fonction hydroxyle en position 8 sont présents sous deux formes, lorsque les analyses sont réalisées dans le CD<sub>3</sub>OD, alors qu'ils existent sous une forme unique dans le CDCl<sub>3</sub>. Cela serait dû à une rupture partielle d'une liaison hydrogène intramoléculaire, se produisant dans un solvant protique tel le CD<sub>3</sub>OD. Nous pensons que les deux isomères en C-8 décrits par Issa *et al.* lors de l'isolement du piptocarphol (composé **PS17**) sont en fait deux conformères provenant du phénomène de dédoublement des signaux. En effet, même si les données RMN ne sont pas publiées dans cette étude pour les deux isomères décrits, il semble probable que le solvant utilisé ait été le CD<sub>3</sub>OD comme c'est le cas pour un autre composé décrit dans l'article (Issa *et al.*, 2006). Les deux isomères seraient en fait deux conformères comme décrits dans ce travail.

La mise en évidence de ce phénomène de dédoublement des signaux pourrait donc éviter de futures erreurs d'interprétation des spectres de RMN réalisés dans le CD<sub>3</sub>OD pour des hirsutinolides 8-hydroxylés. Enfin, au cours de la recherche de nouveaux paramètres permettant d'analyser ces composés, nous avons montré que les analyses de RMN des hirsutinolides dans le CD<sub>3</sub>OD permettent d'améliorer la détection des signaux <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C en *J-modulé* et zgpg30, même à température ambiante. Le CD<sub>3</sub>OD peut donc constituer un bon solvant lors des premières étapes d'identifications des composés, les analyses obtenues dans le CDCl<sub>3</sub> pouvant décourager la poursuite des analyses.

Enfin, les composés isolés semblent être particulièrement sensibles à la dégradation. Il conviendrait par la suite d'étudier l'influence des différents solvants deutérés sur leur stabilité.

## V. Études de la fragmentation des hirsutinolides

Une étude analytique des hirsutinolides isolés a été réalisée par spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) et fragmentation séquentielle lors d'un stage de 3 mois au sein du laboratoire LDRI (Bruxelles, Belgique). Le composé **PS17** n'a pas pu être étudié en détail car isolé plus tardivement. L'étude de la fragmentation des composés en MS a été réalisée grâce à une source d'ionisation ESI sur la base des données fournies par la littérature (Wu *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2010). Le mode positif a été choisi car il est 200 fois plus sensible que le mode négatif et permet de détecter l'adduit sodé de la molécule en abondance dans la source, lorsque l'ion majoritaire obtenu en mode négatif est un ion fragment (**Figure 105**). Les profils HRMS et HRMS<sup>n</sup> des composés ont d'abord été étudiés par injection directe puis par couplage UHPLC-DAD-MS/MS. Les réglages d'optimisation de l'appareil ont été réalisés à partir du composé **PS11**, utilisé comme standard (voir Matériel et Méthodes).



**Figure 105** : Comparaison des spectres de masse obtenus par injection directe pour le composé **PS11** (0,5 mg/mL dans CH<sub>3</sub>OH 100%) en ESI, mode négatif (A) et mode positif (B).

### V. 1. Infusion directe

#### V. 1.1. Analyses en Full-HRMS-ESI(+)

Le **Tableau 15** présente les résultats obtenus pour les composés analysés par HRMS-ESI(+). L'ensemble des spectres obtenus présente un ion intense correspondant à l'adduit sodé  $[M+Na]^+$ . L'adduit potassium est également détecté dans une moindre mesure ainsi que certains ions fils déjà formés dans la source. Pour les composés 8-hydroxylés **PS15** et **PS16**, un deuxième ion correspondant à  $[M+H-H_2O]^+$  est également détecté à une forte intensité.

**Tableau 15** : Analyses des composés par injection directe en full-HRMS-ESI(+).

Analyses HRMS								
Comp.	M (g/mol)	[M+Na] <sup>+</sup>				Principaux ions produits <i>m/z</i> (abondance relative en %)		
		<i>m/z</i> mesuré	<i>m/z</i> calculé	erreur (ppm)	Formule			
PS9	382	405,15223	405,15199	0,6	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub> Na	421 (32) [M+K] <sup>+</sup>	405 (bp) [M+Na] <sup>+</sup>	–
PS11	396	419,13185	419,13125	1,4	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub> Na	435 (13) [M+K] <sup>+</sup>	419 (bp) [M+Na] <sup>+</sup>	359 (28) [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>
PS13	422	445,14701	445,14690	0,2	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>9</sub> Na	461 (13) [M+K] <sup>+</sup>	445 (bp) [M+Na] <sup>+</sup>	359 (32) [M+Na-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )COOH] <sup>+</sup>
PS14	408	431,16753	431,16764	-0,3	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub> Na	447 (59) [M+K] <sup>+</sup>	431 (bp) [M+Na] <sup>+</sup>	345 (40) [M+Na-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )COOH] <sup>+</sup>
PS15	354	377,12105	377,12069	1,0	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub> Na	393 (7) [M+K] <sup>+</sup>	377 (36) [M+Na] <sup>+</sup>	337 (bp) [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
PS16	340	363,14174	363,14142	0,9	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub> Na	379 (9) [M+K] <sup>+</sup>	363 (bp) [M+Na] <sup>+</sup>	323 (92) [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>

bp = pic de base (intensité relative 100%)

## V. 1.2. Analyses en HRMS-ESI(+)-MS<sup>n</sup>

Les analyses de fragmentation MS<sup>2</sup> (**Tableau 16**), MS<sup>3</sup> et MS<sup>4</sup> (**Tableau 17**) ont été réalisées à partir de l'ion généralement le plus intense, formé dans la source, soit [M+Na]<sup>+</sup>. Le schéma de la **Figure 106** présente le chemin de fragmentation hypothétique des molécules.

Les spectres obtenus suite à la fragmentation de l'ion [M+Na]<sup>+</sup> en MS<sup>2</sup> présentent :

- Un ion majoritaire correspondant à l'ion [M+Na-R<sub>2</sub>OH]<sup>+</sup> pour l'ensemble des composés, à l'exception de **PS15**<sup>12</sup>. On observe ainsi deux ions fils diagnostiques selon la nature du substituant R<sub>1</sub> suite à la perte du groupement R<sub>2</sub>OH :
  - à *m/z* 345 (C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>Na) pour les hirsutinolides ayant un substituant R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.
  - à *m/z* 359<sup>13</sup> (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>Na) pour les hirsutinolides ayant un substituant R<sub>1</sub> = COCH<sub>3</sub>

<sup>12</sup> Pour les composés du **PS15** et **PS16**, hydroxylés en C-8, la perte de R<sub>2</sub>OH correspond à la perte d'une molécule d'eau (18 uma) et pourrait également provenir des deux autres fonctions hydroxyles présentes dans ces molécules. L'origine du OH perdu ne peut pas être confirmée sur la base de ces premières analyses.

<sup>13</sup> L'ion à *m/z* 359 est également détecté dans une moindre mesure pour le composé **PS9**, qui possède un substituant acétyle en R<sub>2</sub>. Dans ce cas, l'ion de *m/z* 359 est issu de la perte minoritaire de R<sub>1</sub>OH en fragmentation MS<sup>2</sup> à partir de l'ion [M+Na]<sup>+</sup>. Il constitue de toute façon un ion diagnostique de la présence d'un substituant acétyle dans la molécule.

- Un ion  $[M+Na-H_2O]^+$  pour les composés ayant un groupement  $R_1$  de nature éthylique (**PS9**, **PS14**, **PS16**).
- Un ion  $[M+Na-R_1OH-R_2OH]^+$  de  $m/z$  299 ( $C_{15}H_{16}O_5Na$ ), qui est issu des pertes des groupements  $R_1OH$  et  $R_2OH$ , simultanées ou successives, et qui est un ion diagnostique du noyau hirsutinolide.
- Enfin, un ion  $[M+Na-R_1OH]^+$  de faible intensité est présent. Dans le cas de **PS15**, son intensité est plus importante et il s'agit du pic de base.

Les analyses de fragmentation  $MS^3$  et  $MS^4$  ont été réalisées sur les ions fils principaux formés à partir de l'ion  $[M+Na]^+$  en  $MS^2$  (**Tableau 17**). On note :

- La présence de l'ion diagnostique  $[M+Na-R_1OH-R_2OH]^+$  à  $m/z$  299. Cet ion est stable et n'a pas pu être fragmenté, même avec une énergie de collision élevée.
- La présence de la perte d'un groupement cétène  $CH_2=C=O$  (42 uma), à partir de l'ion à  $m/z$  359, pour les molécules acétylées<sup>14</sup> en  $R_1$  et/ou  $R_2$ , donnant lieu à un nouveau ion diagnostique à  $m/z$  317,10. Cette perte est suivie de la perte d'une molécule d'eau en  $MS^4$  conduisant à l'ion à  $m/z$  299.
- Des pertes de 18 ( $H_2O$ ), 28 ( $CO$ ) et 44 uma ( $CO_2$ ), observées seulement à partir de l'ion fils à  $m/z$  345 conduisant aux ions à  $m/z$  327, 317,14 et 301 et caractéristiques des composés ayant un substituant  $R_1=CH_2CH_3$ .

Finalement, un schéma de fragmentation a pu être établi pour ces molécules : la perte du groupement  $R_2OH$  est privilégiée à partir de l'adduit sodé formé dans la source, permettant d'identifier la masse du substituant  $R_2$ . Dans le cas des composés **PS15** et **PS16**, la perte de 18 uma à partir de l'ion  $[M+Na]^+$  ne peut pas être attribuée de manière sûre à la perte de  $R_2OH$  mais cela semble l'hypothèse la plus probable du fait de la fragilité de cette position pour les autres composés estérifiés. Cette fragmentation est ensuite suivie par la perte du groupement  $R_1OH$  aboutissant à l'ion diagnostique à  $m/z$  299, stable. L'ion correspondant à  $[M+Na-R_1OH]^+$  est détecté sur les spectres obtenus en  $MS^2$ , à faible intensité et permet de discriminer  $R_1$  et  $R_2$ . La fragmentation du composé **PS15** conduit aux ions fils caractéristiques de sa structure ( $m/z$  359, 317,10 et 299), mais dans des proportions différentes des autres composés. Ces analyses ont finalement permis d'identifier plusieurs ions diagnostiques pour les molécules étudiées, résumés dans le **Tableau 18**.

<sup>14</sup> Le substituant  $R_2$  des composés **PS9** et **PS11** est un acétyle.



**Tableau 16** : Analyses HRMS-ESI(+)-MS<sup>2</sup> des composés par introduction directe

Comp.	Full HRMS		HRMS <sup>2</sup>			
	[M+Na] <sup>+</sup> m/z		Principaux ions produits m/z (abondance relative en %)			
<b>PS9</b>	405	<b>405-&gt;</b>	387 (6) [M+Na-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	359 (5) [M+Na-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH] <sup>+</sup>	345 (100) [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	-
<b>PS11</b>	419	<b>419-&gt;</b>	359 (100) [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	299 (7) [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	-	-
<b>PS13</b>	445	<b>445-&gt;</b>	385 (16) [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	359 (100) [M+Na-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )COOH] <sup>+</sup>	299 (12) [M+Na-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )COOH-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	-
<b>PS14</b>	431	<b>431-&gt;</b>	413 (8) [M+Na-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	385 (9) [M+Na-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH] <sup>+</sup>	345 (100) [M+Na-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )COOH] <sup>+</sup>	299 (2) [M+Na-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )COOH] <sup>+</sup>
<b>PS15</b>	377	<b>377-&gt;</b>	359 (28) [M+Na-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	335 (13) [M+Na-CH <sub>2</sub> CO] <sup>+</sup>	317,10 (100) [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	299 (7) [M+Na-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>
<b>PS16</b>	363	<b>363-&gt;</b>	345 (100) [M+Na-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	317,10 (19) [M+Na-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH] <sup>+</sup>	-	-

Energie de collision : 20 eV

**Tableau 17** : Analyses HRMS-ESI(+)-MS<sup>3</sup> et MS<sup>4</sup> des composés par introduction directe

Comp.	HRMS <sup>3</sup>				HRMS <sup>4</sup>	
	Principaux ions produits <i>m/z</i> (abondance relative en %.)				Principaux ions produits <i>m/z</i> (abondance relative en %)	
PS9	387->	327 (100) [M+Na-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	-	-	-	-
	359->	317,10 (54) [M+Na-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH-CH <sub>2</sub> CO] <sup>+</sup>	299 (100) [M+Na-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	-	317->	299 (13) [M+Na-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH-CH <sub>2</sub> CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
	345->	327 (47) [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	317,14 (12) [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH-CO] <sup>+</sup>	301 (57) [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	299 (100) [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH] <sup>+</sup>	-
PS11	359->	317,10 (13) [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH-CH <sub>2</sub> CO] <sup>+</sup>	299 (100) [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	-	317->	299 (100) [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH-CH <sub>2</sub> CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
PS13	385->	299 (100) [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )COOH] <sup>+</sup>	-	-	-	-
	359->	317,10 (14) [M+Na-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )COOH-CH <sub>2</sub> CO] <sup>+</sup>	299 (100) [M+Na-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )COOH-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	-	317->	299 (100) [M+Na-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )COOH-CH <sub>2</sub> CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
PS14	345->	327 (35) [M+Na-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )COOH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	317,14 (18) [M+Na-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )COOH-CO] <sup>+</sup>	301 (35) [M+Na-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )COOH-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	299 (100) [M+Na-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )COOH-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH] <sup>+</sup>	-
PS15	359->	317,10 (53) [M+Na-H <sub>2</sub> O-CH <sub>2</sub> CO] <sup>+</sup>	299 (100) [M+Na-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	-	317->	299 (60) [M+Na-H <sub>2</sub> O-CH <sub>2</sub> CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
	335->	317,10 (47) [M+Na-CH <sub>2</sub> CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	299 (3) [M+Na-CH <sub>2</sub> CO-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	291 (100) [M+Na-CH <sub>2</sub> CO-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	317->	299 (71) [M+Na-CH <sub>2</sub> CO-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
PS16	345->	327 (50) [M+Na-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	317,14 (15) [M+Na-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	301 (91) [M+Na-H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	299 (100) [M+Na-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH] <sup>+</sup>	-
	317->	299 (48) [M+Na-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	-	-	-	-

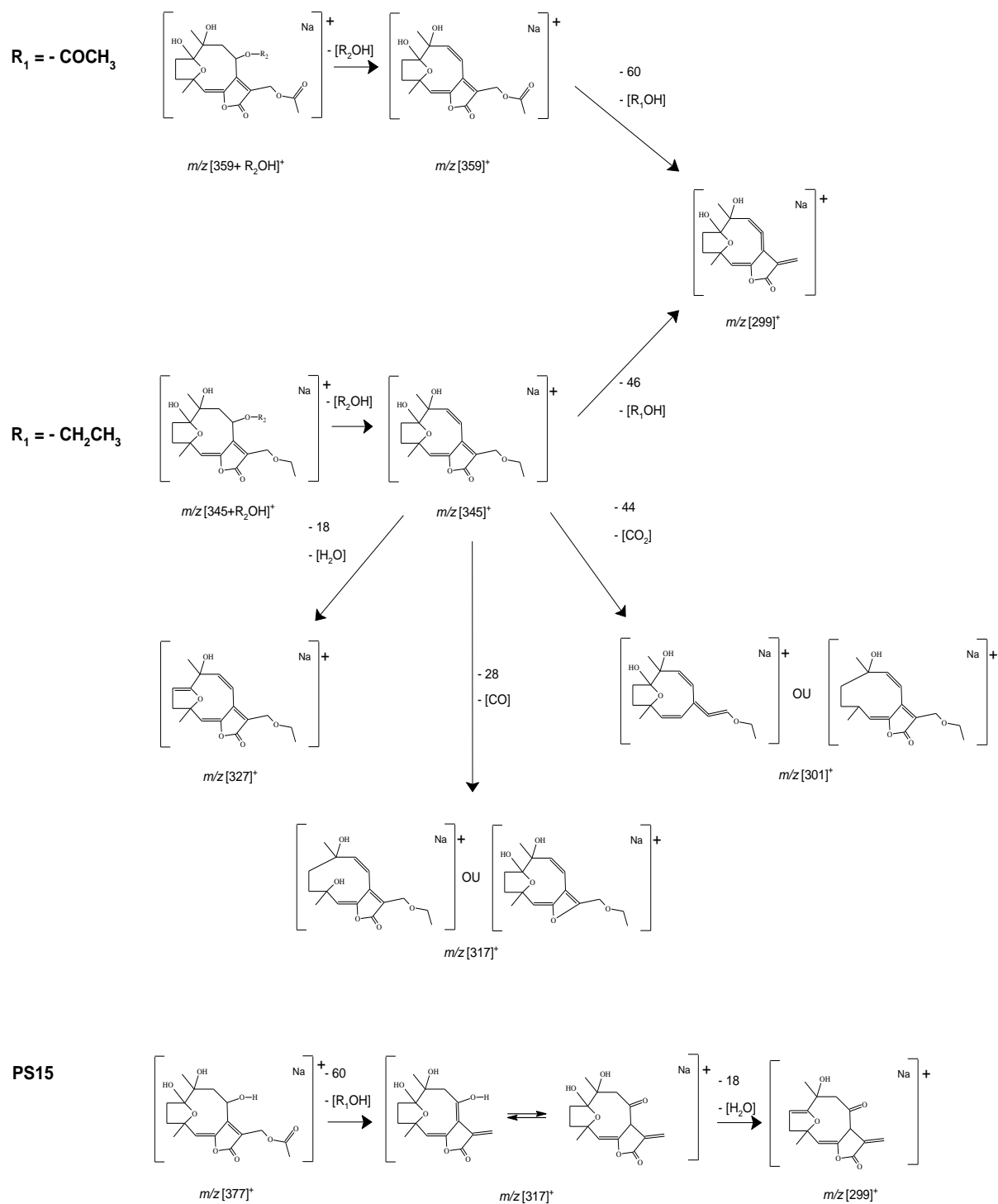
Energie de collision : 20 eV

**Tableau 18** : Ions diagnostiques observés pour les hirsutinolides étudiés selon la nature de leurs substituants R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>.

	<i>m/z</i> calculés des ions diagnostiques* (MS <sup>n</sup> )			
<b>Tous composés</b>	299,0890 [C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> Na] <sup>+</sup>			
<b>R<sub>1</sub>=CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></b>	345,1309 [C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub> Na] <sup>+</sup>	327,1203 [C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub> Na] <sup>+</sup>	317,1359 [C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub> Na] <sup>+</sup>	301,14103 [C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> Na] <sup>+</sup>
<b>R<sub>1</sub>(ou R<sub>2</sub>)=COCH<sub>3</sub></b>	359,1101 [C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub> Na] <sup>+</sup>		317,0996 [C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub> Na] <sup>+</sup>	

\*La présence de ces ions est confirmée pour chaque molécule lorsque les valeurs de *m/z* mesurées correspondent aux valeurs de *m/z* calculées (données dans le tableau) pour chaque ion, avec une marge d'erreur inférieure à 3 ppm.

Un schéma de fragmentation hypothétique a également pu être proposé pour ces molécules et est présenté à la **Figure 106**. La fragmentation décrite ici n'est qu'une proposition parmi d'autres hypothèses possibles. L'ionisation en ESI(+) entraîne la formation d'un carbocation au sein de la molécule. Du fait de la structure particulière des hirsutinolides et de la présence d'un système conjugué étendu, de très nombreux réarrangements sont possibles conduisant à de nombreuses formes mésomères. Il est donc difficile de prévoir une hypothèse de structure en particulier. Les pertes de CO et CO<sub>2</sub> décrites pour l'ion à *m/z* 345 peuvent avoir lieu au niveau de la fonction hémicétal ou du noyau lactone. Crotti et collègues ont publié en 2004 un article présentant l'ensemble des mécanismes de fragmentation de noyaux furanones simples, synthétiques, substitués ou non en α, en spectrométrie de masse séquentielle ESI(+) (Crotti *et al.*, 2004). Sur la base de la stabilité des carbocations obtenus, plusieurs mécanismes d'ouverture de chaîne ont été proposés conduisant à plusieurs structures possibles pour les ions formés. Dans la majorité des cas, le cycle lactone perd une molécule de CO, mais ne perd pas de CO<sub>2</sub>. Il est donc plus probable que les pertes observées pour l'ion à *m/z* 345 proviennent de la fonction hémiacétal, fragile, plutôt que de la lactone. Des analyses de spectrométrie de masse plus poussées seraient nécessaires. L'utilisation d'une méthode de spectrométrie de masse avec échange d'hydrogène/deutérium pourrait, par exemple, permettre de fournir plus d'informations sur les ions formés. Il faudrait néanmoins parvenir à deutérer un seul des hydroxyles présents dans la structure.



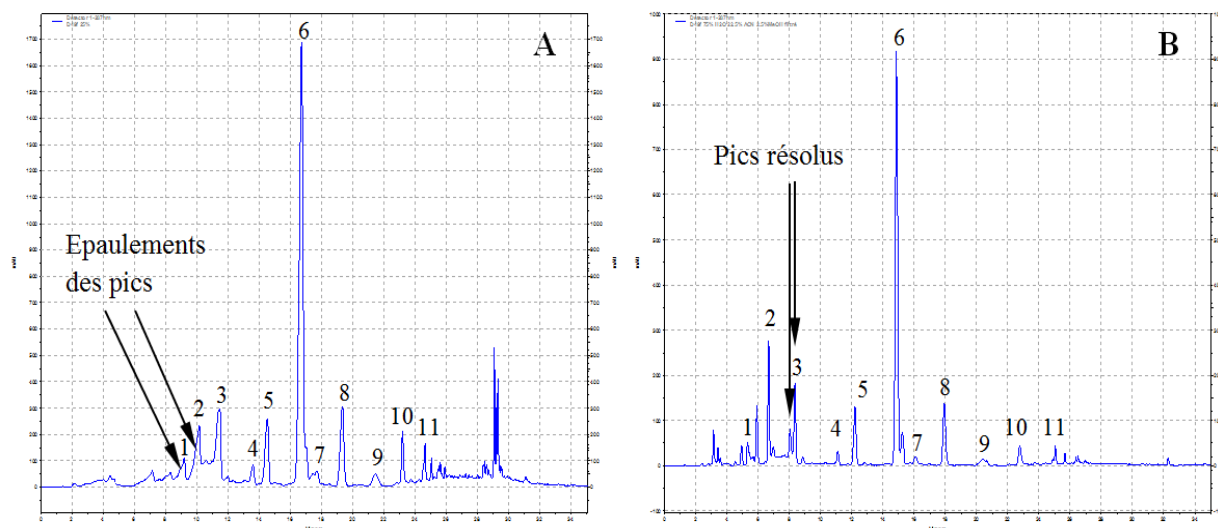
**Figure 106 :** Chemin de fragmentation hypothétique proposé pour les composés étudiés en fonction de la nature des substituants R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> et sur la base des spectres de masses obtenus en analyses HRESI(+)-MS séquentielles, en injection directe à partir de l'ion [M+Na]<sup>+</sup>.

## V. 2. Analyse par UHPLC-HRESI(+)-MS

Les composés ont été analysés par UHPLC-HRESI(+)-MS afin de confirmer leur schéma de fragmentation dans ces conditions. Le système de solvant utilisé est inspiré des conditions développées par Gobbo-Neto *et al.* pour l'identification de métabolites secondaires d'une espèce de *Vernoniaeae* par HPLC-DAD-MS/MS, incluant des lactones sesquiterpéniques (Gobbo-Neto et Lopes, 2008). La phase mobile est constituée d'un solvant A ( $\text{H}_2\text{O}$ , 2%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) et d'un solvant B (MeCN/MeOH/ $\text{CH}_3\text{COOH}$  88:10:2).

### V. 2.1. Profils chromatographiques

Les composés ont été préparés à une concentration de 0,5 mg/mL dans un mélange de  $\text{H}_2\text{O}$ /MeCN/MeOH (75:22,5:2,5) correspondant aux conditions de gradient UHPLC initiales. Cela permet d'améliorer très nettement la résolution des pics chromatographiques (**Figure 107**). L'ensemble des composés présente une longueur d'onde maximale d'absorption  $\lambda_{\text{max}}$  proche de 285 nm.



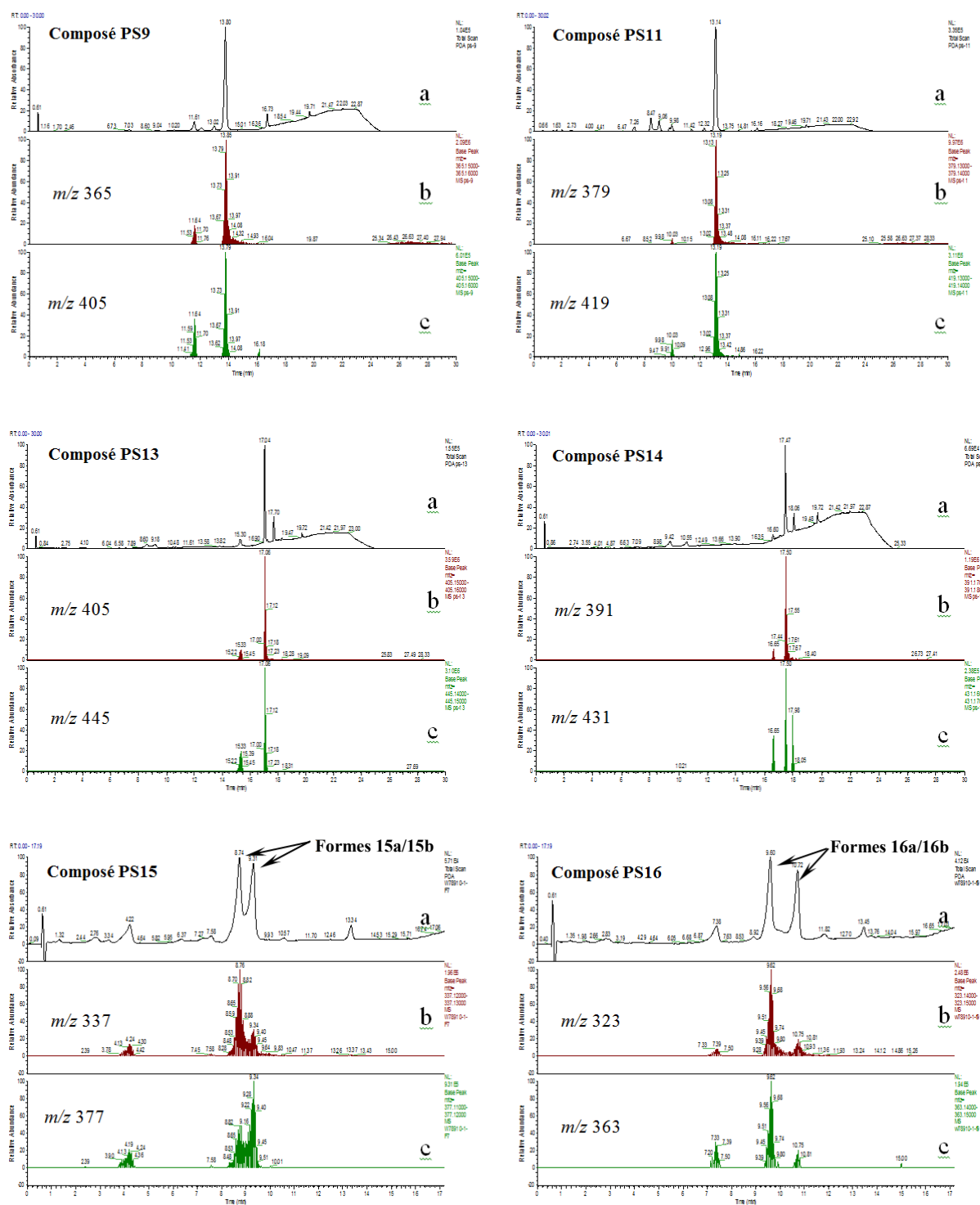
**Figure 107** : Comparaison des chromatogrammes ( $\lambda=285$  nm) obtenus pour une fraction de *P. spiralis* enrichie en STLs.

Les échantillons sont dissous dans un mélange de  $\text{H}_2\text{O}$ /MeCN (75:25) (A) ou un mélange de  $\text{H}_2\text{O}$ /MeCN/MeOH (75: 22,5: 2,5) suivi d'une filtration de la solution micellaire obtenue grâce à un filtre nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  (B).

Les chromatogrammes obtenus pour l'ensemble des composés analysés sont présentés en **Figure 108(a)**. Il apparaît tout d'abord :

- 1 pic chromatographique principal pour les composés **PS9**, **PS11**, **PS13**, **PS14**.
- 2 pics chromatographiques principaux rejoints par leur base pour les composés **PS15** et **PS16**, au lieu d'un seul pic chromatographique attendu.

En conditions UHPLC, deux ions caractéristiques sont formés dans la source (voir V.2.2) :  $[M+H-H_2O]^+$  majoritairement et  $[M+Na]^+$  de plus faible intensité. Afin de comprendre les profils chromatographiques obtenus, nous avons donc recherché, pour chacun des échantillons, le signal correspondant aux valeurs  $m/z$  de ces deux ions (avec une précision au centième). La **Figure 108(b)** présente le signal obtenu pour la recherche de l'ion  $[M+H-H_2O]^+$  et la **Figure 108 (c)** le signal obtenu pour la recherche de l'ion  $[M+Na]^+$ .



**Figure 108 :** Chromatogrammes PDA (total scan) (a) et traces ioniques des ions caractéristiques obtenus en full-MS  $[M+H-H_2O]^+$  (b) et  $[M+Na]^+$  (c), pour chaque composé. Les ions ont été recherchés avec un intervalle de  $m/z$  incluant, avec une précision au 1/100, les valeurs de  $m/z$  calculées

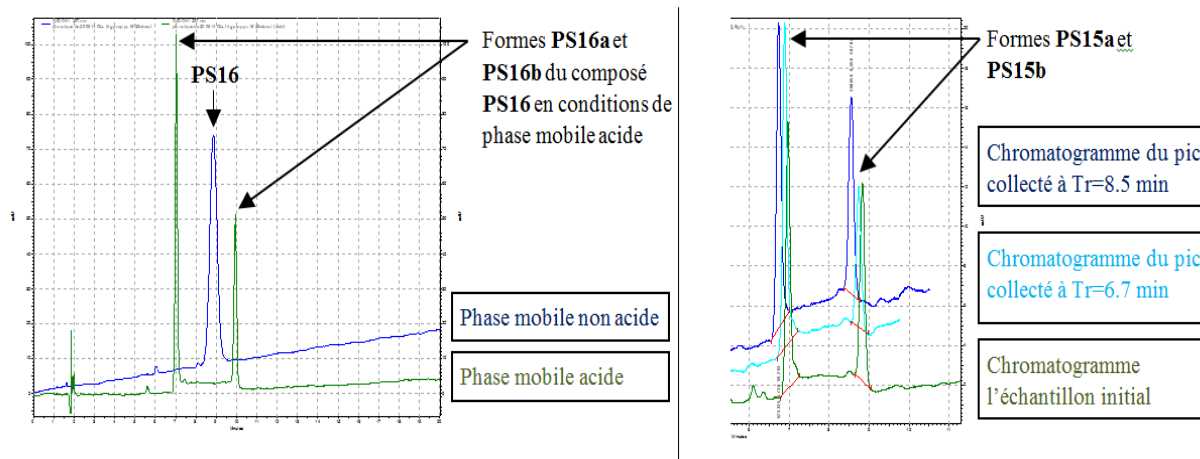
Tout d'abord, on constate que les deux pics chromatographiques majoritaires obtenus dans le cas des composés **PS15** et **PS16** ont les mêmes masses et sont donc des isomères. Si l'on s'intéresse à la fragmentation des deux formes a et b de chacun des composés en MS (**Tableau 22**), on constate qu'elle conduit aux mêmes ions fils.

Afin de comprendre le phénomène entraînant la présence de deux pics pour ces composés, nous avons réalisé deux analyses (**Figure 109**) :

- Le composé **PS16** a été soumis à une analyse HPLC dans les mêmes conditions de phase mobile mais sans acide. Un seul pic apparaît alors. Le pic unique obtenu dans ces conditions a été collecté par HPLC semi-préparative et immédiatement analysé par HPLC dans les mêmes conditions de phase mobile, mais cette fois-ci en présence d'acide. Deux pics chromatographiques apparaissent. L'expérience a été réalisée pour les composés **PS15** et **PS17** et mène à la même conclusion.
- Une expérience similaire a alors été réalisée pour le composé **PS15**. Une analyse réalisée par HPLC semi-préparative en condition de phase mobile acide a permis de collecter chacun des deux pics majoritaires obtenus. Chaque « pic collecté » a ensuite été immédiatement analysé par HPLC (en conditions acides). Pour chacun des pics collectés, le chromatogramme obtenu présente bien deux pics.

Ces résultats suggèrent que les deux pics chromatographiques obtenus en conditions acides pour ces composés correspondent à deux formes en équilibre. Etant donné que seuls les composés hydroxylés en position 8 (**PS15**, **PS16** et **PS17**) présentent ce profil chromatographique atypique, nous pensons que le phénomène est lié à la présence de la fonction 8-OH. Nous avons décrit dans le chapitre précédent que les analyses de RMN réalisées dans le CD<sub>3</sub>OD pour ces composés conduisaient à la formation de deux formes en équilibre (IV.3). Cela semble dû, probablement, à la rupture partielle d'une liaison hydrogène intramoléculaire au sein du macrocycle. La réalisation des analyses HPLC en conditions acides pourrait également entraîner la rupture partielle de cette liaison. Cette hypothèse est appuyée par la comparaison des proportions relatives des aires des pics chromatographiques avec celles calculées précédemment pour les intensités des signaux de RMN <sup>1</sup>H obtenus dans le CD<sub>3</sub>OD (IV.3). Le **Tableau 19** résume ces résultats.





**Figure 109** : Chromatogrammes des composés **PS15** et **PS16** en conditions de phase mobile acide et non acide.

À gauche : chromatogrammes obtenus dans des conditions de phase mobile acide et non acide (A (H<sub>2</sub>O) and B (MeCN /MeOH 90:10) pour le composé **PS16** (27 à 29% MeCN).

À droite : chromatogrammes obtenus en condition acides pour les deux pics collectés à Tr=6.7 min et Tr=8.5 min (27 à 28% MeCN) en HPLC semi-préparative pour le composé **PS-15** en comparaison avec le chromatogramme de l'échantillon original (phase mobile acide).

**Tableau 19** : Comparaison des proportions relatives des pics chromatographiques a et b pour les composés **PS15** et **PS16**, avec les résultats obtenus pour les formes A et B présentes dans le CD<sub>3</sub>OD, en RMN <sup>1</sup>H.

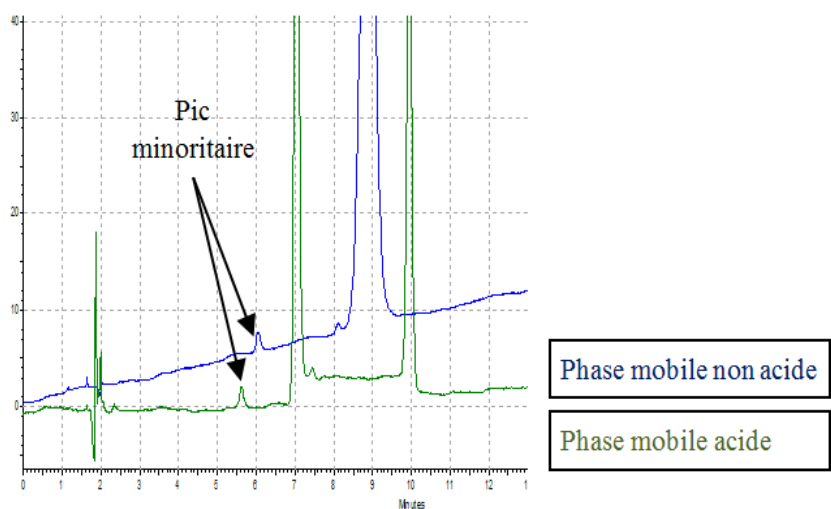
Composés	Intensité relative des signaux RMN <sup>1</sup> H*		Intensité relative des aires sous les pics**	
	Forme A	Forme B	Pic a (Tr min)	Pic b (Tr max)
<b>PS15</b>	48%	52%	52%	48%
<b>PS16</b>	53%	47%	57%	43%
<b>PS17</b>	58%	42%	43%	57%

\*Résultats obtenus sur la moyenne des intégrations des signaux de RMN <sup>1</sup>H obtenus dans le CD<sub>3</sub>OD.

\*\*Résultats calculés d'après les aires d'absorbances de chaque pic.

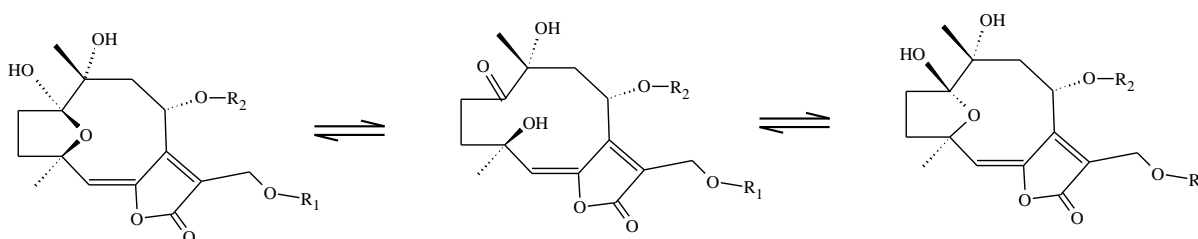
Par ailleurs, pour l'ensemble des composés, on remarque à chaque fois la présence d'un pic chromatographique minoritaire à un temps de rétention plus court que le(s) pic(s) principal(aux). Ces composés présentent en MS les mêmes ions caractéristiques que les composés de référence **Figure 108** avec la même précision de masse. Ils sont présents dans un *ratio* de 7 à 13 % du pic principal. Par ailleurs, ils semblent apparaître indépendamment des conditions d'acidité de la phase mobile (**Figure 110**). Ces composés peuvent être des diastéréoisomères ou bien encore des conformères. Une hypothèse possible pouvant expliquer leur présence est une mutarotation au niveau de la fonction hémicétal en position 1-4 pouvant conduire à la formation de deux épimères comme indiqué à la **Figure 111**. L'ouverture du cycle furanone au niveau du carbone hémicétalique de lactones

sesquiterpéniques de type germacranolides a déjà été décrit par G. Xu et collègues (Xu *et al.*, 2008) et le phénomène de mutarotation en conditions HPLC est bien connu pour les sucres (Pazourek, 2010). De nouvelles analyses seraient nécessaires pour identifier la nature de ces pics. Une possibilité serait de pouvoir les collecter par HPLC préparative et les caractériser par les techniques d'élucidations structurales usuelles. Si cela n'est pas réalisable, ils pourraient être collectés et analysés de façon isolée en HPLC, comme nous l'avons fait pour les pics majoritaires de **PS15** et **PS16**, afin d'étudier au moins leur comportement. Enfin, une technique de couplage HPLC-RMN est également envisageable si les quantités sont suffisantes.



**Figure 110** : Chromatogrammes du composé **PS16**, repurifié par HPLC semi-préparative, en conditions de phase mobile acide et non acide.

Un pic minoritaire est présent à un temps de rétention plus court.



**Figure 111** : Mutarotation possible au niveau du carbone hémiacétalique pouvant expliquer l'éventuelle épimérisation des composés

## V. 2.2. Fragmentation

Les ions obtenus en spectrométrie de masse (full-MS) pour ces pics ont été analysés. On note la présence de l'adduit sodé  $[M+Na]^+$ , de plus faible intensité que pour les spectres obtenus en injection directe, et un ion très intense, voire principal, à  $m/z$   $[M+H-H_2O]^+$ . Les résultats obtenus pour ces ions sont présentés dans le **Tableau 20**. Dans le cas des composés

**PS15** et **PS16**, les résultats sont donnés pour les deux pics chromatographiques majoritaires. Un certain nombre d'autres ions (**Tableau 23**) sont présents de façon significative dans la source et correspondent aux adduits  $[2M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  et à certains ions fils directement produits dans la source à la fois à partir des ions parents  $[M+Na]^+$  et  $[M+H-H_2O]^+$ . La fragmentation de l'adduit sodé est la même que décrite précédemment (voir V.1.1). La fragmentation MS/MS à partir de l'ion  $[M+H-H_2O]^+$  est présentée dans le **Tableau 22**, ainsi que la fragmentation de certains ions fils formés en abondance dans la source.

**Tableau 20** : Ions  $[M+Na]^+$  et  $[M+H-H_2O]^+$  obtenus en full-MS pour les composés analysés par UHPLC-HR ESI(+)MS.

Analyses UHPLC-HRMS						
Principaux ions produits $m/z$ (abondance relative en %)						
Comp.	tr (min)	$[M+Na]^+$	$[M+H-H_2O]^+$			Formule
		$m/z$ mesuré	$m/z$ mesuré	$m/z$ calculé	erreur (ppm)	
<b>PS9</b>	13,80	405,15073 (28)	365,15848 (bp)	365,15948	-2,7	$C_{19}H_{25}O_7$
<b>PS11</b>	13,19	419,13016 (39)	379,13788 (bp)	379,13874	-2,0	$C_{19}H_{23}O_8$
<b>PS13</b>	17,04	445,14562 (91)	405,15330 (bp)	405,15439	-2,7	$C_{21}H_{25}O_8$
<b>PS14</b>	17,47	431,16646 (20)	391,17420 (bp)	391,17513	-2,4	$C_{21}H_{27}O_7$
<b>PS15a*</b>	8,74	377,11981 (27)	337,12734 (bp)	337,12818	-2,5	$C_{17}H_{21}O_7$
<b>PS15b*</b>	9,31	377,11982 (bp)	337,12741 (80)	337,12818	-2,3	$C_{17}H_{21}O_7$
<b>PS16a*</b>	9,60	363,14067 (9)	323,14817 (bp)	323,14891	-2,3	$C_{17}H_{23}O_6$
<b>PS16b*</b>	10,71	363,14074 (7)	323,14807 (bp)	323,14891	-2,6	$C_{17}H_{23}O_6$

\* Pour les composés **PS15** et **PS16**, a et b correspondent respectivement aux deux pics obtenus avec le temps de rétention (tr en min) le plus bas (a) et le plus long (b).

On note pour la fragmentation de l'ion  $[M+H-H_2O]^+$ :

- La présence d'un ion diagnostique  $[M+H-H_2O-R_1OH-R_2OH]^+$  à  $m/z$  259  $[C_{15}H_{15}O_4]^+$ , pour tous les composés.
- La présence des ions diagnostiques issus de l'ion à  $m/z$  259 : les ions  $[259-H_2O]^+$  détectés à  $m/z$  241  $[259-CO]^+$  à  $m/z$  231 et les ions fragments à  $m/z$  217, 215, 213, 203, 199, 189 et 187, présents en plus faible abondance.
- Un ion majoritaire correspondant à l'ion  $[M+H-H_2O-R_2OH]^+$  pour l'ensemble des composés (à l'exception de **PS15** et **PS16** qui se fragmentent directement et majoritairement pour donner l'ion  $[M+H-H_2O-R_1OH-H_2O]^+$  à  $m/z$  259<sup>15</sup>).
- Deux ions fils diagnostiques selon la nature du substituant  $R_1$  suite à la perte du groupement  $R_2OH$ , plus ou moins abondants :
  - à  $m/z$  305 ( $C_{17}H_{21}O_5$ ) pour les hirsutinolides ayant un substituant  $R_1 = CH_2CH_3$ .

<sup>15</sup> Là encore, la deuxième perte d'une molécule de  $H_2O$  peut provenir de  $R_2OH$  ou des deux autres fonctions hydroxyles présentes dans ces molécules. L'origine de cette perte d'eau ne peut donc pas être confirmée sur la base de ces premières analyses.

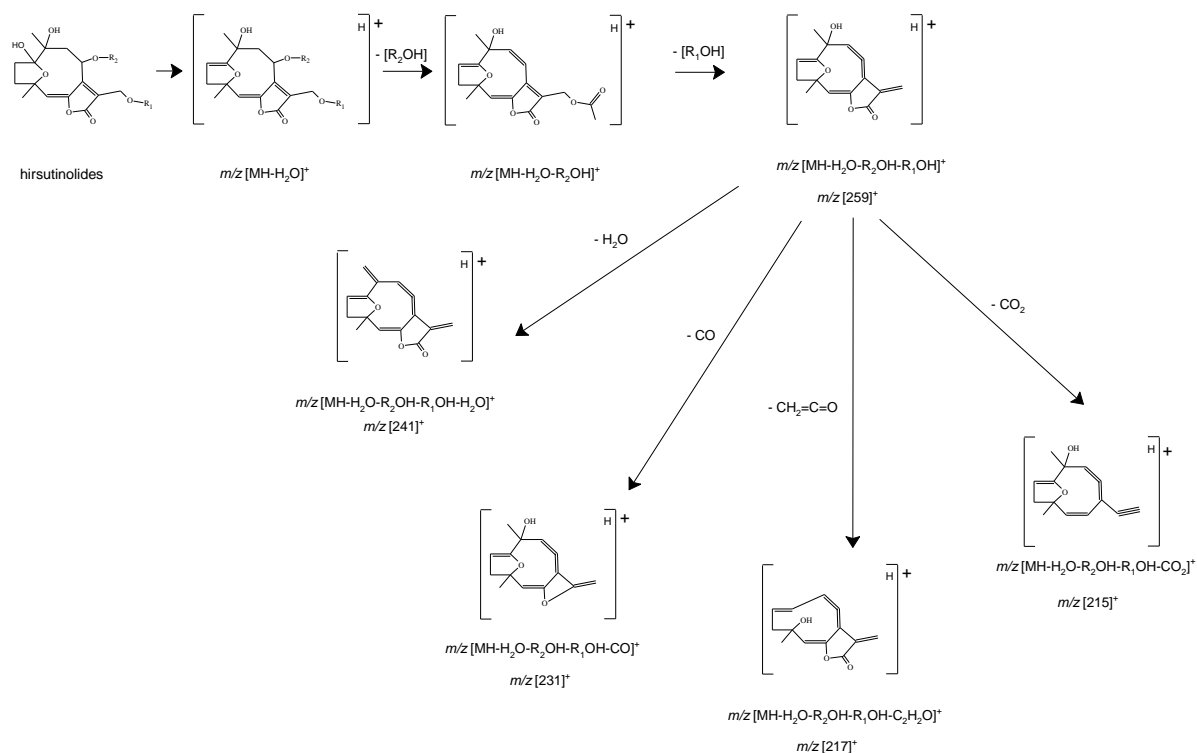
➤ à  $m/z$  319 ( $C_{17}H_{19}O_6$ ) pour les hirsutinolides ayant un substituant  $R_1 = COCH_3$

Finalement, mise à part les exceptions que constituent **PS15** et **PS16**, un schéma de fragmentation peut être établi pour ces molécules et correspond finalement au même schéma que celui obtenu pour l'adduit sodé. La perte du groupement en  $R_2OH$  est privilégiée à partir de l'ion  $[M+H-H_2O]^+$  formé dans la source, permettant d'identifier la masse du substituant en position  $R_2$ . Cette fragmentation est suivie par la perte du groupement  $R_1OH$  aboutissant à l'ion diagnostique à  $m/z$  259 qui se fragmente ensuite en plusieurs ions diagnostiques. L'ion correspondant à  $[M+H-H_2O-R_1OH]^+$ , minoritaire (sauf pour **PS15** et **PS16**), est détecté dans certains cas et permet de discriminer  $R_1$  et  $R_2$ . Par ailleurs, ces analyses ont permis d'identifier plusieurs ions diagnostiques pour le noyau des molécules isolées, résumés dans le **Tableau 21**. Certains de ces ions sont directement détectables dans la source suite à l'analyse en full-MS des composés (**Tableau 23**). Les structures hypothétiques des ions diagnostiques majoritaires du noyau sont proposés à la **Figure 112**.

**Tableau 21** : Ions diagnostiques observés pour les hirsutinolides étudiés selon la nature de leurs substituants  $R_1$  et  $R_2$ .

	<i>m/z</i> calculés des ions diagnostiques* (MS <sup>n</sup> )				
<b>Tous composés</b>	259,0965 [C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	241,0859 [C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	231,1016 [C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	217,0859 [C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	215,1067 [C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
	213,0910 [C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	203,1067 [C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	199,0754 [C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	189,0910 [C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	187,1117 [C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> O] <sup>+</sup>
<b>R<sub>1</sub>=CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></b>	305,1383 [C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>				
<b>R<sub>1</sub>= COCH<sub>3</sub></b>	319,1170 [C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>				

\*La présence de ces ions est confirmée pour chaque molécule lorsque les valeurs de  $m/z$  mesurées correspondent aux valeurs de  $m/z$  calculées (données dans le tableau) pour chaque ion, avec une marge d'erreur inférieure à 3 ppm.



**Figure 112** : Chemin de fragmentation hypothétique proposé pour le noyau hirsutinolide des composés isolés sur la base des spectres de masses obtenus en analyses UHPLC-HRESI(+)-MS/MS à partir de l'ion  $[MH-H_2O]^+$ .

**Tableau 22** : Ions majoritaires produits à partir des analyses MS<sup>2</sup> réalisées sur l'ion de  $m/z$   $[M+H-H_2O]^+$  et des principaux ions fragments formés dans la source, par UHPLC-HRESI(+)-MS/MS

LC-HRMS			LC-HRMS/MS												
Comp.	$m/z$ $[M+H-H_2O]^+$		Principaux ions produits $m/z$ (abondance relative en %)												
PS9	365,16	365** ->	305 (bp, 100)d	287 (1)	261 (7)	259 (5)e	241 (2)	231 (0.4)	223 (0.1)	217 (0.4)	215 (7)	213 (1)	199 (2)	189 (1)	187 (2)
		305d ->	259 (51)e	241 (68)	231 (47)	217 (9)	215 (19)	213 (37)							
		259e ->	241 (bp, 100)	231 (95)	217 (58)	215 (13)	213 (56)	199 (24)	189 (12)	187 (4)					
PS11	379,14	379** ->	337 (5)	319 (bp, 100)c,d	301 (2)	277 (16)	259 (40)	241 (20)	231 (15)	223 (1)	217 (8)	215 (4)	213 (15)	203 (2)	199 (5) 189 (1) 187 (2)
		319c,d ->	277 (bp, 100)	259 (71)e	241 (52)	231 (31)	217 (25)	215 (59)	213 (33)	199 (17)	187 (6)				
		277->	259 (93)e	241 (25)	231 (71)	217 (9)	213 (24)								
		259e ->	241 (bp, 100)	231 (66)	217 (46)	215 (14)	213 (52)	203 (9)	199 (22)	189 (9)	187 (4)				
PS13	405,15	405** ->	345 (26)c	319 (pb, 100)d	301 (2)	277 (17)	259 (49)e	241 (25)	231 (20)	217 (7)	215 (5)	213 (20)	203 (2)	199 (4)	189 (2) 187 (1)
		259e ->	241 (bp, 100)	231 (84)	217 (51)	215 (15)	213 (52)	203 (9)	199 (23)	189 (11)	187 (3)				
PS14	391,17	391**->	345 (2)c	305 (bp, 100)d	261 (8)	259 (5)e	241 (1)	215 (7)	199 (2)	187 (2)					
		259e ->	241 (bp, 100)	231 (77)	217 (53)	215 (16)	213 (56)	203 (6)	199 (27)	189 (19)					
PS15a*	337,13	337** ->	319 (2)d	277 (80)c	259 (bp, 100)e	241 (9)	235 (19)	231 (39)	217 (52)	215 (2)	213 (11)	203 (10)	199 (35)	189 (2)	187 (1)
		277c ->	259 (84)	241 (5)	231 (84)	217 (31)	213 (7)	189 (6)							
		259e ->	241 (50)	231 (bp, 100)	217 (47)	215 (4)	213 (33)	203 (5)	199 (19)	189 (11)					
PS15b*	337,13	337** ->	319 (8)d	277 (68)c	259 (bp, 100)e	241 (9)	235 (31)	231 (25)	217 (72)	203 (55)	199 (42)				
		259e ->	241 (74)	231 (bp, 100)	217 (54)	215 (7)	213 (45)	203 (7)	199 (19)	189 (10)					
PS16a*	323,15	323** ->	305 (17)d	287 (6)	277 (48)c	261 (0.2)	259 (bp, 100)e	241 (16)	231 (45)	217 (25)	215 (3)	213 (13)	199 (16)	189 (3)	187 (2)
		259e ->	241 (47)	231 (100)	217 (62)	213 (29)	199 (15)	189 (13)							
PS16b*	323,15	323** ->	305 (25)d	287 (4)	277 (46)c	259 (bp, 100)e	241 (27)	231 (41)	217 (40)	213 (20)	199 (21)	189 (4)	187 (1)		
		259e ->	241 (42)	231 (70)	217 (42)	213 (17)									

\*\* :  $[M+H-H_2O]^+$  ; c :  $[M+H-H_2O-HOR_1]^+$  ; d :  $[M+H-H_2O-HOR_2]^+$  ; e :  $[M+H-H_2O-HOR_1-HOR_2]^+$ . Energie de collision : 35 eV

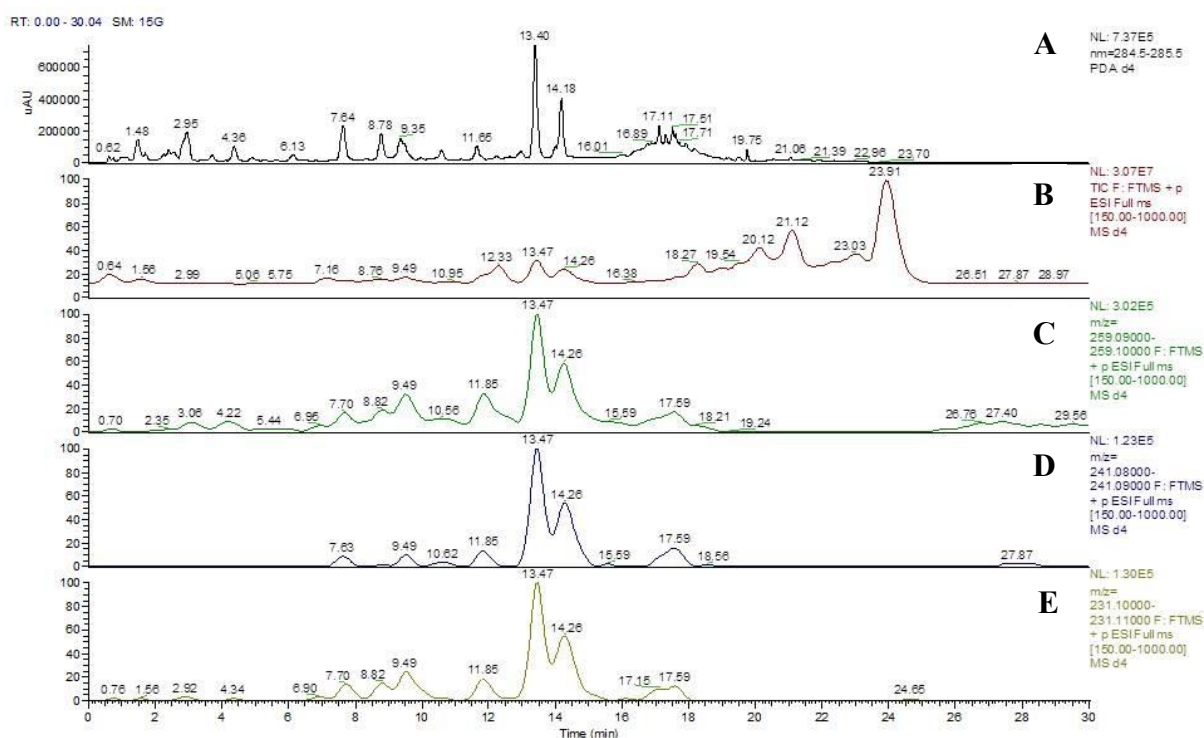
**Tableau 23** : Analyses des composés en full-MS par UHPLC-HR ESI(+) MS.

Comp.	LC-HRMS												
	Principaux ions produits $m/z$ (Abondance relative en %)												
<b>PS9</b>	<b>787</b> (10)	<b>421</b> (3)	<b>405</b> (28)*	<b>365</b> (bp)**	<b>345</b> (2)b	<b>323</b> (12)	<b>305</b> (58)d	<b>287</b> (9)	<b>261</b> (9)	<b>259</b> (15)e	<b>241</b> (6)	<b>231</b> (6)	
<b>PS11</b>	<b>815</b> (22)	<b>435</b> (7)	<b>419</b> (39)*	<b>414</b> (6)	<b>393</b> (7)	<b>379</b> (bp)**	<b>359</b> (4)a,b	<b>337</b> (6)	<b>319</b> (32)c,d	<b>301</b> (5)	<b>277</b> (18)	<b>259</b> (23)e	<b>241</b> (10) <b>231</b> (10)
<b>PS13</b>	<b>867</b> (32)	<b>461</b> (15)	<b>445</b> (91)*	<b>419</b> (11)	<b>405</b> (bp)**	<b>359</b> (12)b	<b>345</b> (18)c	<b>319</b> (25)d	<b>301</b> (6)	<b>277</b> (8)	<b>259</b> (24)e	<b>241</b> (9)	<b>231</b> (8)
<b>PS14</b>	<b>839</b> (6)	<b>431</b> (20)*	<b>391</b> (bp)**	<b>323</b> (11)	<b>305</b> (60)d	<b>287</b> (10)	<b>261</b> (10)	<b>259</b> (21)e	<b>241</b> (8)	<b>231</b> (5)			
<b>PS15*</b>	<b>731</b> (20)	<b>393</b> (5)	<b>377</b> (27)*	<b>337</b> (bp)**	<b>301</b> (6)	<b>277</b> (14)c	<b>259</b> (12)e	<b>241</b> (2)	<b>231</b> (5)				
<b>PS15*</b>	<b>731</b> (26)	<b>393</b> (11)	<b>377</b> (bp)*	<b>337</b> (80)**	<b>277</b> (16)c	<b>259</b> (17)e	<b>241</b> (1)	<b>231</b> (6)					
<b>PS16*</b>	<b>703</b> (15)	<b>363</b> (9)*	<b>323</b> (bp)**	<b>305</b> (6)	<b>277</b> (5)c	<b>259</b> (14)e	<b>241</b> (1)	<b>231</b> (5)					
<b>PS16*</b>	<b>363</b> (7)*	<b>323</b> (bp)**	<b>259</b> (17)e	<b>231</b> (4)									

\*:  $[M+Na]^+$ ; \*\*:  $[M+H-H_2O]^+$ ; a:  $[M+Na-HOR_1]^+$ ; b:  $[M+Na-HOR_2]^+$ ; c:  $[M+H-H_2O-HOR_1]^+$ ; d:  $[M+H-H_2O-HOR_2]^+$ ; e:  $[M+H-H_2O-HOR_1-HOR_2]^+$

### V. 3. Application de la méthode UHPLC-DAD-ESI-MS<sup>2</sup>/MS à la déréplication d'un extrait de *P. spiralis*

La phase méthanolique **D4** obtenue à partir du **lot D** (II.2.2) a été déréplicée grâce à la méthode UHPLC-DAD-HRMS-ESI(+)-MS/MS mise au point précédemment. La détection des molécules a été suivie à une longueur d'onde d'absorption  $\lambda$  de 285 nm. Les signaux des 3 ions diagnostiques à  $m/z$  259, 241, et 231 ont été recherchés afin de sélectionner les molécules d'intérêt (**Figure 113**). Le programme de fragmentation est *data-dependent* (voir Matériel et Méthodes), la fragmentation MS/MS des molécules recherchées a pu être réalisée lorsque l'ion majoritaire formé dans la source correspondait soit à  $[M+H-H_2O]^+$  soit à  $[M+Na]^+$ . Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 24**.



**Figure 113** : Déréplication de la fraction méthanolique **D4**.

**A** : Chromatogramme obtenu à  $\lambda = 285\text{nm}$  ; **B** : signal TIC (Total Ion Current) ; **C** : Trace ionique de l'ion diagnostique de  $m/z = [259,09-259,10]$  ; **D** : Trace ionique de l'ion de  $m/z = [241,08-241,09]$  ; **E** : Trace ionique de l'ion de  $m/z = [231,10-231,11]$ .



**Tableau 24** : Molécules détectées suite à la déréplication de la fraction **D4** par UHPLC-DAD-HRMS-ESI(+)-MS/MS

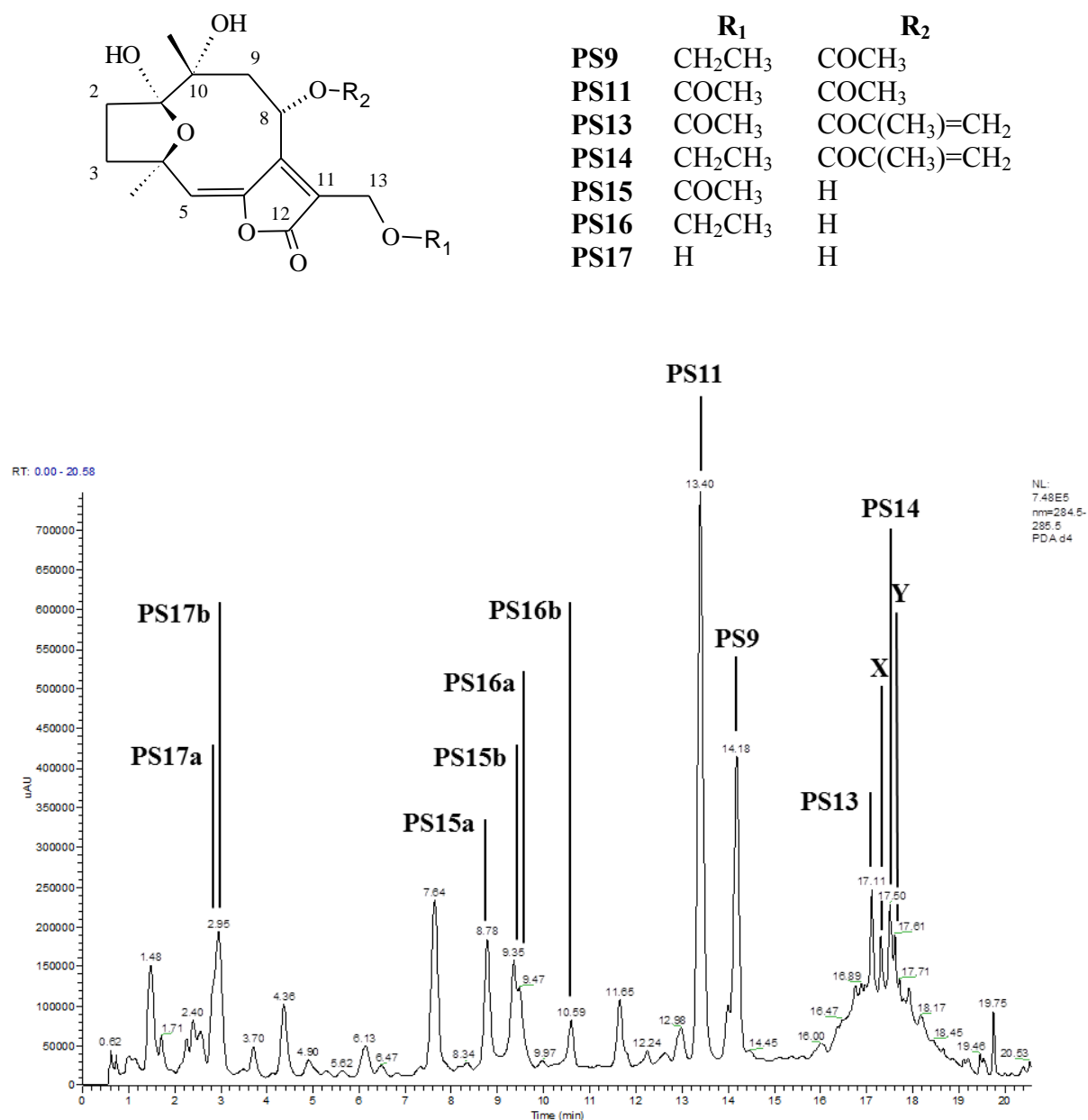
Full MS (intensité relative en %)						
Comp.	Tr (min)	M (g/mol)	Formule	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup> sur l'ion le plus abondant dans la source (intensité relative)
<b>PS17a</b>	2,87	312	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	-	295,11720 (100)	NF
<b>PS17b</b>	2,99	312	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	335,10954 (3)	295,11722 (100)	295,12 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> -> <b>277</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> (61), <b>259</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> (100), <b>241</b> (12), <b>231</b> (52), <b>217</b> (23), <b>215</b> (2), <b>213</b> (13), <b>203</b> (4), <b>199</b> (14), <b>189</b> (3), <b>187</b> (2)
<b>PS15a</b>	8,82	354	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	377,12012 (37)	337,12769 (100)	337,13 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> -> <b>277</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup> (100), <b>259</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup> (98), <b>241</b> (6), <b>231</b> (34), <b>217</b> (46), <b>213</b> (11), <b>199</b> (26)
<b>PS15b</b>	9,38	354	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	377,12006 (100)	337,12769 (78)	377,12 [M+Na] <sup>+</sup> -> <b>359</b> [M+Na-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> (40), <b>317</b> [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup> (100)
<b>PS16a</b>	9,49	340	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	363,14023 (6)	323,14847 (100)	323,15 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> -> <b>305</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> (16), <b>287</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> (6), <b>277</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH] <sup>+</sup> (52), <b>259</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH] <sup>+</sup> (100), <b>241</b> (16), <b>231</b> (39), <b>217</b> (26), <b>215</b> (3), <b>213</b> (12), <b>203</b> (3), <b>199</b> (16)
<b>PS16b</b>	10,62	340	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	-	323,14856 (100)	NF
<b>PS11</b>	13,41	396	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	419,13049 (67)	379,13788 (100)	379,14 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> -> <b>319</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup> (100), <b>277</b> [M+H-CH <sub>3</sub> COOH-CH <sub>2</sub> C=O] <sup>+</sup> (15), <b>259</b> [M+H-CH <sub>3</sub> COOH-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup> (36), <b>241</b> (18), <b>231</b> (13), <b>217</b> (6), <b>213</b> (13), <b>203</b> (1), <b>199</b> (3), <b>187</b> (1)
<b>PS9</b>	14,18	382	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	405,15141 (16)	365,15894 (100)	365,16 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> -> <b>323</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-CH <sub>2</sub> C=O] <sup>+</sup> (1), <b>305</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup> (100), <b>287</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> COOH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> (1), <b>259</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> COOH-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH] <sup>+</sup> (5), <b>241</b> (2), <b>231</b> (1), <b>215</b> (6), <b>213</b> (1), <b>199</b> (2), <b>187</b> (2)

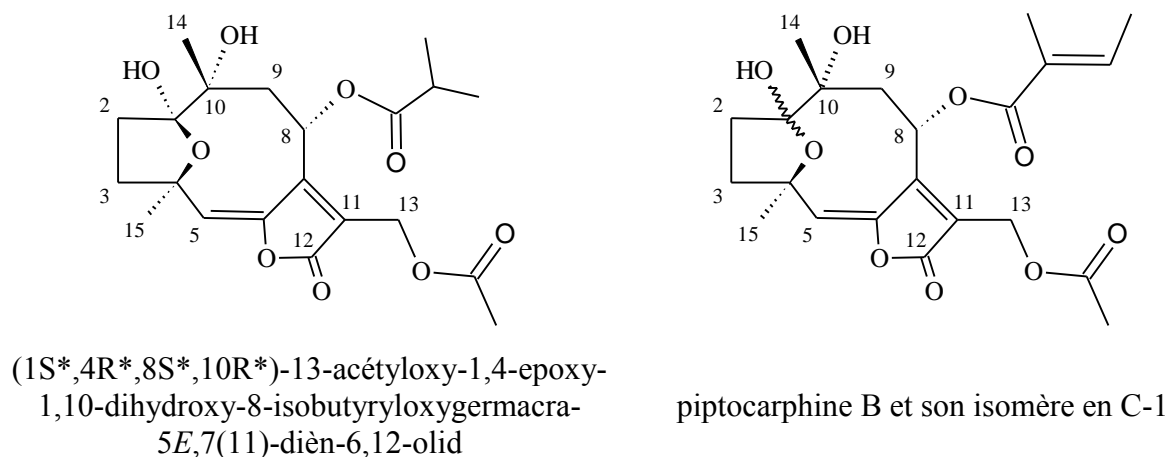
Full MS (intensité relative en %)						
Comp.	Tr (min)	M (g/mol)	Formule	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup> sur l'ion le plus abondant dans la source (intensité relative)
PS13	17,11	422	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>9</sub>	445,14597 (100)	405,15356 (78)	445,15 [M+Na] <sup>+</sup> -> <b>359</b> [M+Na-H <sub>2</sub> C=(CH <sub>3</sub> )COOH] <sup>+</sup> (100), <b>299</b> [M+Na-H <sub>2</sub> C=(CH <sub>3</sub> )COOH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> (3)
X	17.34	424	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>	447,16174 (100)	407.16940 (86)	447,16 [M+Na] <sup>+</sup> -> <b>429</b> [M+Na-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> (2), <b>405</b> [M+Na-CH <sub>2</sub> C=O] <sup>+</sup> (1), <b>387</b> [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup> (1), <b>359</b> [M+Na-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> (100), <b>299</b> [M+Na-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup> (7)
PS14	17,53	408	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	431,16660 (9)	391,17426 (100)	391,17 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> -> <b>345</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH] <sup>+</sup> (2), <b>305</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> (100), <b>259</b> [M+H-H <sub>2</sub> O-C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH] <sup>+</sup> (6), <b>241</b> (2), <b>231</b> (1), <b>217</b> (5), <b>215</b> (8), <b>213</b> (1), <b>199</b> (3), <b>189</b> (1), <b>187</b> (2)
Y	17,65	436	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>	459,16162 (100)	419,16943 (87)	459,16 [M+Na] <sup>+</sup> -> <b>441</b> [M+Na-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> (1), <b>399</b> [M+Na-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup> (5), <b>359</b> [M+Na-C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> (100), <b>299</b> [M+Na-C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup> (5)

NF: ion non fragmenté en MS/MS car il ne correspondait pas à l'ion le plus abondant formé dans la source parce que son intensité était trop faible.

L'ensemble des hirsutinolides isolés de *P. spiralis* est bien détecté dans l'échantillon analysé D4 (**Figure 114**).

Deux nouveaux composés ont par ailleurs pu être détectés, le composé **X** (tr=17,34 min) et le composé **Y** (tr=17,65 min). Le composé **X** élimine majoritairement un fragment de 88 uma à partir de l'adduit sodé à  $m/z$  447. La formule proposée par la masse haute résolution pour cette perte est de  $C_4H_8O_2$  et peut correspondre à un résidu isobutyrate. Etant donné qu'il s'agit de la perte principale, ce fragment correspond le plus probablement à  $R_2OH$ . L'ion fils formé a une valeur de  $m/z$  de 359 indiquant la présence d'un groupement acétyle, le plus probablement en position  $R_1$ . Cela est confirmé par la perte de 60 uma conduisant à l'ion diagnostique à  $m/z$  299. Ce composé pourrait donc correspondre au (1S\*,4R\*,8S\*,10R\*)-13-acétyloxy-1,4-époxy-1,10-dihydroxy-8-isobutyryloxygermacra-5E,7(11)-dièn-6,12-olide, précédemment isolé de l'espèce *Vernonanthura squamulosa* (Kotowicz *et al.*, 1998) (**Figure 115**). Le composé **Y** perd majoritairement 100 uma à partir de l'adduit sodé à  $m/z$  459, correspondant à un fragment de formule brute  $C_5H_8O_2$ . De la même façon cela conduit à un ion fils à  $m/z$  359, indiquant la présence d'un groupement acétyle en  $R_1$ . La structure de ce composé pourrait correspondre à celle de deux composés, la piptocarphine B qui possède un ester de tiglate en position C-8 (Covall *et al.*, 1981) ou bien son isomère en C-1, isolé de l'espèce *Vernonanthura squamulosa* (Kotowicz *et al.*, 1998) (**Figure 115**). La perte de  $C_5H_8O_2$  pourrait également correspondre à un isomère du tiglate, à savoir un ester d'angélate en position C-8.

Figure 114 : Chromatogramme de la fraction D4 ( $\lambda = 285$  nm)



**Figure 115** : Structures proposées pour les composés **X** (à gauche) et **Y** (à droite) détectés dans la fraction méthanolique **D4**

#### V. 4. Discussion

Les techniques analytiques développées pour l'étude des STLs sont rares dans la littérature. Cela est particulièrement vrai au regard du grand nombre de STLs isolées (Schmidt, 2006) et en comparaison avec d'autres classes de métabolites secondaires comme les flavonoïdes.

Le dernier état des lieux des différentes techniques analytiques appliquées à l'analyse des STLs a été publié par Merfort et collègues, en 2002 (Merfort, 2002). Plus récemment, en 2012, Dias *et al.* ont entrepris une révision de l'utilisation de la spectrométrie de masse par électroébulisaison (ESI) et en tandem, dans l'élucidation structurale et la déréplication de produits naturels, incluant quelques STLs (Dias *et al.*, 2012). Il existe ensuite quelques études portant sur la fragmentation de différentes classes de STLs (Sartori *et al.*, 2014) ou sur la détection de STLs connus dans des extraits de plantes par HPLC (Sakamoto *et al.*, 2005) et LC-MS (Wu *et al.*, 2010 ; Shi *et al.*, 2011).

Finalement, peu de méthodes de couplage par HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> ont été optimisées dans un but de déréplication. On peut citer le travail de Gobbo-Neto et Lopes sur la déréplication de goyazensolides et éremantolides (Gobbo-Neto et Lopes, 2008) ou encore l'étude de Yang *et al.* s'intéressant à la composition en STLs de type germacrane de l'espèce *Eupatorium lindleyanum* (Yang *et al.*, 2010). Concernant les STLs de type hirsutinolides, deux études doivent être citées. Tout d'abord les travaux préliminaires d'Appezato-da-Gloria *et al.* au sujet de la structure et l'ultrastructure des poils sécréteurs d'espèces de Vernoniaceae (Appezato-da-Gloria *et al.*, 2012) et enfin les travaux de cartographie métabolique d'espèces de *Vernonia* par LC-MS, publiés par Martucci *et al.* (Martucci *et al.*, 2014). Ces travaux portent sur l'analyse de la composition d'échantillons par LC-UV-MS. Les STLs (incluant certains hirsutinolides) ont été détectés et identifiés par leur temps de rétention et leur fragmentation en ESI(+)-MS, comparés aux données obtenues soit pour des standards, soit

publiées dans la littérature. Jusqu'ici, aucun travail de recherche n'a porté sur l'étude de la fragmentation de STLs de type hirsutinolide.

Le travail réalisé dans cette thèse représente donc une contribution dans la recherche de techniques analytiques appliquées à l'étude des hirsutinolides et des lactones sequiterpéniques plus généralement. La fragmentation de six des sept hirsutinolides isolés de *P. spiralis* a été analysée par spectrométrie de masse haute résolution en mode ESI positif, en injection directe et par couplage UHPLC-DAD-HRMS/MS. Les deux principaux ions formés dans la source avec le type d'appareil utilisé (LTQ Orbitrap) lors des analyse LC-MS de ces composés, sont les ions  $[M+Na]^+$  et  $[M+H-H_2O]^+$ . De ces deux ions dérivent ensuite les ions fragments formés en  $MS^n$ . L'analyse des composés en injection directe nous a permis d'étudier le profil de fragmentation de l'ion  $[M+Na]^+$ . Plusieurs ions fils diagnostiques ont alors été identifiés et en particulier l'ion commun à tous les composés, l'ion  $[C_{15}H_{16}O_5Na]^+$  de  $m/z$  299. Les analyses réalisées par couplage UHPLC-HRMS-ESI(+)-MS/MS nous ont ensuite permis d'établir le profil de fragmentation du deuxième ion caractéristique formé dans nos conditions matérielles,  $[M+H-H_2O]^+$ . Plusieurs ions fragments diagnostiques ont également été identifiés : les ions principaux à  $m/z$  259  $[C_{15}H_{15}O_4]^+$ , 241  $[C_{15}H_{13}O_3]^+$  et 231  $[C_{14}H_{15}O_3]^+$  mais aussi à  $m/z$  217, 215, 213, 203, 199, 189 et 187. Par ailleurs, d'autres ions diagnostiques ont été proposés selon la nature des substituants  $R_1$  et  $R_2$  des molécules.

Les résultats obtenus dans ce travail sont en adéquation avec les fragmentations publiées dans la littérature pour les quelques hirsutinolides analysés par LC-MS (Appezato-da-Glória *et al.*, 2012 ; Martucci *et al.*, 2014). Cette méthode apparaît donc transférable à d'autres appareils dans la mesure où les deux travaux précédents ont été réalisés grâce à des spectromètres de masse de type Q-TOF.

Il a été décrit dans le chapitre introduction (A.III.5) que les hirsutinolides pouvaient être des artefacts issus de la transformation du glaucolide lors des phases d'extractions et de fractionnement. D'après la publication de Martucci *et al.*, certains STLs de type glaucolides semblent présenter la même fragmentation que les hirsutinolides (voir "supplementary data" de l'article). Etant donné les profils de fragmentations similaires pour les deux types de STLs, on peut s'appuyer sur le profil UV de ces molécules afin de les discriminer dans des extraits complexes. En effet, les hirsutinolides ont une longueur d'onde d'absorption maximale proche de 285 nm, dû à la présence d'un système conjugué étendu de type butadiénolide (Cowall *et al.*, 1981), alors que les glaucolides ont un  $\lambda_{max}$  proche de 230 nm, ayant seulement une double liaison conjuguée avec la lactone (Favi *et al.*, 2008). La méthode de couplage développée ici devrait donc permettre de discriminer les glaucolides des hirsutinolides dans des extraits et de confirmer l'origine naturelle ou non des STLs au sein de la plante.

## VI. Évaluation de l'activité biologique des composés

En raison de la dégradation des composés **PS9** et **PS14** au cours des analyses d'identification structurale, seules 5 molécules (**PS11**, **PS13**, **PS15**, **PS16** et **PS17**) ont pu être évaluées pour leurs activités biologiques.

### VI. 1. Évaluation de l'activité antipaludique

Le **Tableau 25** résume les résultats obtenus pour l'évaluation de l'activité antipaludique *in vitro* des molécules isolées, sur la souche résistante à la chloroquine FcM29-Cameroon de *Plasmodium falciparum*. La cytotoxicité sur lignées cellulaires saines VERO, cellules épithéliales rénales de singe, a également été reportée dans ce tableau.

**Tableau 25** : Activités antipaludiques des molécules testées et cytotoxicité sur lignées cellulaires saines VERO.

Composés	CI <sub>50</sub> (μM) <i>P. falciparum</i> *	CC <sub>50</sub> (μM) VERO**	Indices de sélectivité
<b>PS11</b>	7,8 ± 1,2	3,7 ± 1,5	0,5
<b>PS13</b>	6,9 ± 0,9	1,8 ± 0,07	0,3
<b>PS15</b>	50 (n=1)	17,6 ± 8,0	0,4
<b>PS16</b>	54,9 ± 3,4	75,2 ± 37	1,4
<b>PS17</b>	Non stable	90 ± 40	ND
<b>Chloroquine</b>	549,2 ± 68 nM	-	-
<b>Artémisinine</b>	13,9 ± 7,7 nM	-	-

\*L'activité antipaludique a été évaluée sur une souche de *P. falciparum* FcM29 résistante à la chloroquine, par mesure de la radioactivité après incorporation d'hypoxanthine tritiée. \*\*La cytotoxicité sur cellules VERO a été évaluée par spectrophotométrie (voir matériel et méthode). IS = CC<sub>50</sub>(VERO)/CI<sub>50</sub>(*Plasmodium*) ; ND : non déterminé

Les lactones sesquiterpéniques **PS11** et **PS13** sont les composés les plus actifs avec des valeurs de CI<sub>50</sub> de 7,8 μM et 6,9 μM, respectivement. Les composés **PS15** et **PS16** sont considérés comme inactifs sur le parasite (CI<sub>50</sub>>50 μM) et le composé **PS17** présente des activités très différentes, se montrant de plus en plus actif au cours des répétitions de test, suggérant une instabilité dans le milieu de culture. C'est pour cette raison que les résultats concernant **PS17** n'ont donc pas été pris en compte. Parallèlement, il est apparu que les composés les plus actifs **PS11** et **PS13** sont particulièrement cytotoxiques sur lignées cellulaires VERO, avec des valeurs de CC<sub>50</sub> de 3,7 et 1,8 μM, respectivement. Bien que le composé **PS15** présente une moindre cytotoxicité (CC<sub>50</sub>=17,6 μM) par rapport aux composés **PS11** et **PS13**, son activité antipaludique reste non sélective (IS = 0,4). Les composés **PS16** (CC<sub>50</sub>= 75,2 μM) et **PS17** (CC<sub>50</sub>= 90 μM) ne présentent pas de cytotoxicité sur VERO. On

peut noter de manière générale que, bien que les composés soient structuralement proches, leurs activités *in vitro* sur ces 2 modèles parasite et cellulaire, varient significativement. Le composé **PS13** présente dans sa structure un deuxième motif AM, l'ester de méthacrylate en C-8. Cela peut expliquer qu'il s'agisse de la molécule la plus active. Parallèlement, les hirsutinolides présentant un hydroxyle libre en C-8 (**PS15**, **PS16** et **PS17**) sont les composés les moins actifs. L'estérification de l'hydroxyle en position 8 semble donc jouer un rôle important dans l'activité biologique des hirsutinolides.

## VI. 2. Évaluation de l'activité leishmanicide

Le **Tableau 26** résume les résultats obtenus pour l'évaluation des activités leishmanicides *in vitro* des molécules isolées sur promastigotes et amastigotes axéniques de *L. infantum* et leur cytotoxicité sur macrophages murins J774A.1.

**Tableau 26** : Activités leishmanicides des molécules testées et cytotoxicité sur macrophages murins

Composés	CI <sub>50</sub> (μM) promastigotes <i>L. infantum</i>	CI <sub>50</sub> (μM) amastigotes axéniques <i>L. infantum</i>	CC <sub>50</sub> (μM) Macrophages**	Indices de sélectivité
<b>PS11</b>	24,1 ± 4,5	4,7 ± 1,8	1,4 ± 0,08	0,06
<b>PS13</b>	9,5 ± 0,2	2,0 ± 1,4	0,9 ± 0,07	0,09
<b>PS15</b>	86,3 ± 13	17,0 ± 0,6	5,5 ± 1,9	0,06
<b>PS16</b>	31,5 ± 3	5,4 ± 4,4	3,1 ± 1,0	0,10
<b>PS17</b>	> 100	68 ± 14	ND	ND
<b>Amphotéricine B</b>	0,03 ± 0,01	0,34 ± 0,2	2,5 ± 0,2	83
<b>Miltéfosine</b>	8,8 ± 2,8	-	155,3 ± 15,2	18
<b>Pentamidine</b>	0,5 ± 0,3	-	0,53 ± 0,57	1
<b>Doxorubicine</b>	-	-	0,06 ± 0,04	-

\*L'activité leishmanicide a été évaluée *in vitro* sur *L. infantum* aux stades promastigote et amastigote axénique, par mesure de l'activité luciférase. La cytotoxicité sur macrophages murins a été évaluée par spectrophotométrie (voir matériel et méthode). IS = CC<sub>50</sub>(macrophages)/CI<sub>50</sub>(promastigotes). ND : non déterminé

Il apparaît tout d'abord que l'ensemble des molécules testées sont plus actives sur le stade parasite amastigote axénique que promastigote (à l'inverse du témoin Amphotéricine B). Le stade amastigote est la forme parasite présente au sein de l'hôte définitif vertébré, notamment l'Homme. Le composé **PS13** présente l'activité leishmanicide la plus élevée sur les deux stades de *L. infantum* avec des valeurs de CI<sub>50</sub> de 9,5 μM sur promastigotes et de 2,0 μM sur amastigotes axéniques. L'effet leishmanicide observé pour ce composé sur les formes promastigotes (CI<sub>50</sub> = 9,5 μM) est très proche de celui déterminé pour la miltéfosine (CI<sub>50</sub> = 8,8 μM) qui constitue une drogue de référence. Concernant les activités des autres composés



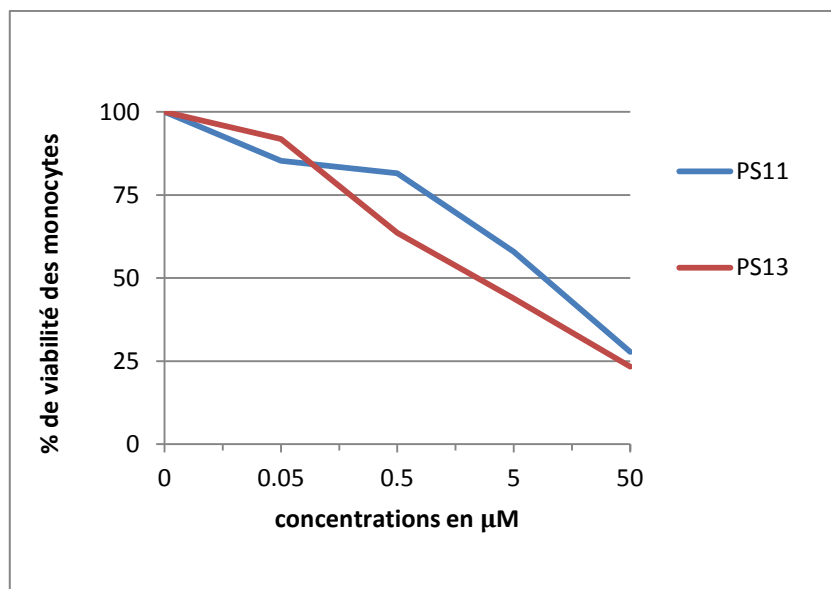
sur l'inhibition des deux stades du parasite, ils peuvent être classés par ordre décroissant d'efficacité de la façon suivante : **PS11** > **PS16** > **PS15** > **PS17**, **PS17** étant totalement inactif contre *L. infantum*. Concernant la cytotoxicité de ces composés sur les macrophages, le composé le plus intéressant, **PS13**, apparaît beaucoup plus cytotoxique sur les macrophages que la miltéfosine, avec une valeur de  $CC_{50}$  de 0,9  $\mu$ M contre 155,3  $\mu$ M pour la molécule de référence. Les autres molécules **PS11**, **PS15** et **PS16** présentent également une cytotoxicité importante avec des valeurs de  $CC_{50}$  comprises entre 1,4 et 5,5  $\mu$ M. **PS17** n'étant pas actif sur le parasite, sa cytotoxicité n'a pas été évaluée sur les macrophages mais il s'était révélé non toxique sur les cellules VERO. De nouveau, le composé **PS13**, présentant dans sa structure un deuxième motif AM, est le plus actif. Les hirsutinolides présentant un hydroxyle libre en C-8 (**PS15** et **PS16**) sont les composés les moins actifs sur Leishmanies et le piptocarphol (**PS17**), le seul composé hydroxylé en C-13, est inactif. L'estérification des hydroxyles en position 8 et 13 semblent donc importante pour l'activité leishmanicide des hirsutinolides. Cela avait déjà été suggéré pour la position 13 par Kuo, concernant leur cytotoxicité (Kuo *et al.*, 2003). Ces paramètres semblent par contre beaucoup moins influencer la cytotoxicité sur les macrophages. Les composés **PS11**, **PS13**, **PS15** et **PS16** ont également été testés sur amastigotes intramacrophagiques de *L. infantum*. Aucun d'eux n'a présenté d'activité à des concentrations inférieures à la valeur de la  $CC_{50}$  sur macrophages, comprises entre 0,2 et 4  $\mu$ M.

### VI. 3. Evaluation de l'activation des monocytes/macrophages humains

Les macrophages sont les cellules hôtes des Leishmanies chez les mammifères. Ils jouent également un rôle important dans la réponse de l'hôte parasité aux pathogènes, notamment à *P. falciparum*. Ces cellules sont capables d'exprimer le récepteur scavenger CD36 à leur surface, récepteur impliqué dans la phagocytose non-opsonique des érythrocytes parasités. L'induction de CD36 pourrait permettre d'augmenter la clairance du *Plasmodium*. Ce récepteur est régulé par deux voies de transcription, interconnectées : la voie Nrf2 et la voie PPAR $\gamma$ . En conditions inflammatoires, il semble que la voie Nrf2 prenne le pas sur la voie PPAR $\gamma$ . Par ailleurs Nrf2 contrôle l'expression de nombreuses enzymes, dont l'hème oxygénase 1. L'induction de cette enzyme diminue la gravité et le risque d'apparition de neuropaludisme chez modèles murins (Jeney *et al.*, 2014 ; Seixas *et al.*, 2009 ; Pamplona *et al.*, 2007) et permet de réduire la parasitémie sanguine, tissulaire et macrophagique chez des souris parasitées par *Trypanosoma cruzi* (Paiva *et al.*, 2012). Les accepteurs de Michael, en tant qu'inducteurs potentiels de ces voies pourraient donc permettre d'augmenter la clairance de *P. falciparum*, de diminuer le risque de neuropaludisme, et de réduire la gravité des parasitoses dues aux kinétoplastidés.

Seules les molécules les plus actives, le diacétylpiptocarphol (**PS11**) et la piptocarphine A (**PS13**), ont été évaluées pour leurs effets sur la promotion de l'expression de gènes cibles cytoprotecteurs ou impliqués dans la polarisation des monocytes/macrophages. Étant donné

la cytotoxicité reportée précédemment sur macrophages murins pour ces composés, il a été décidé de définir les concentrations infratoxiques de ces molécules sur monocytes humains transformés en macrophages. Pour cela, une gamme de concentrations a été réalisée. Les résultats sont présentés à la **Figure 116**.



**Figure 116** : Pourcentage de viabilité des monocytes humains dérivés en macrophages (par rapport au témoin négatif), après 24 h d'incubation en présence de différentes concentrations ( $\mu\text{M}$ ) des composés **PS11** et **PS13**.

Il a été décidé de tester ces deux molécules à une concentration voisine de 6 nM, maintenant une viabilité des monocytes proche de 100%.

### VI. 3.1. Expression de gènes cibles, contrôlée par RT-qPCR

Les composés **PS11** et **PS13** ont donc été testés à une concentration de 6,3 nM et 5,9 nM, respectivement, quant à leurs effets sur l'expression de quatre gènes cibles des monocytes/macrophages:

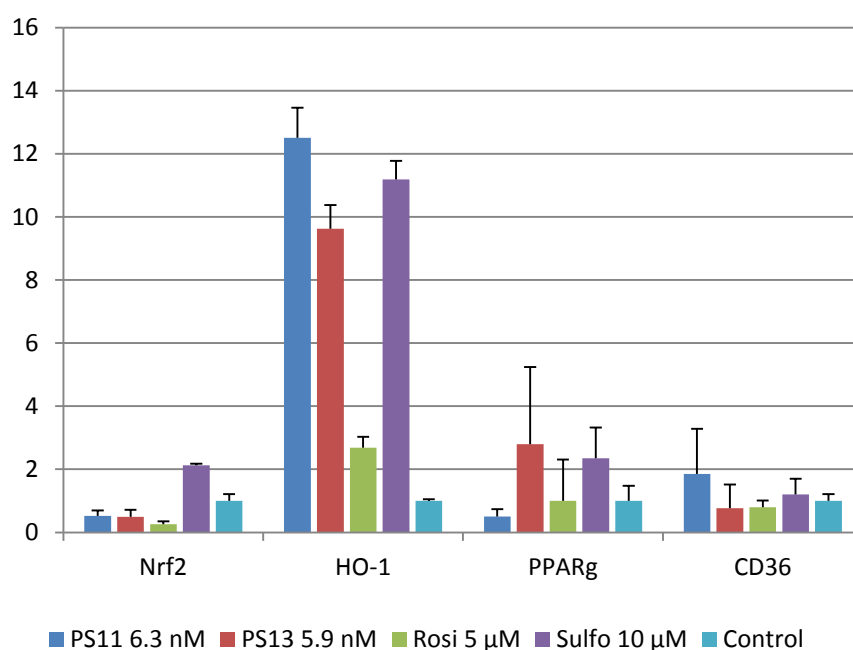
- le gène du facteur de transcription Nrf2 et un gène cible spécifique de cette voie de transcription (Osburn et Kensler, 2008) : le gène codant pour l'enzymes HO-1.
- les gènes du récepteur nucléaire  $\text{PPAR}\gamma$  et du récepteur CD36, gène cible de  $\text{PPAR}\gamma$  en conditions normales.

Le récepteur nucléaire  $\text{PPAR}\gamma$  étant la cible d'agents antidiabétiques appartenant à la classe thérapeutique des thiazolidinediones (Lehmann *et al.*, 1995), la rosiglitazone a été choisie comme molécule servant de témoin positif pour cette voie. Le témoin positif choisi comme activateur de la voie Nrf2 est le sulforaphane, une molécule d'origine naturelle, largement utilisée dans la littérature comme inducteur de la voie Nrf2 (Juge *et al.*, 2007).

Ces essais ont été réalisés sur deux stades différents de monocytes/macrophages : des monocytes humains non différenciés et des monocytes humains différenciés en macrophages, après 48 h d'incubation en présence de M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor).

### VI. 3.1.1 Expression des ARNm de gènes cibles par des monocytes humains non transformés

Les résultats obtenus sur monocytes humains non transformés sont présentés à la **Figure 117** pour les composés **PS11** et **PS13**. L'axe des ordonnées représente les niveaux relatifs d'expression des ARNm des différents gènes étudiés, en fonction des molécules.



**Figure 117** : Effets des composés **PS11** et **PS13** sur les niveaux d'expression des ARNm de gènes cibles (Nrf2, HO-1, PPAR $\gamma$  et CD36) au sein de monocytes humains.

La rosiglitazone (« Rosi », agoniste de PPAR $\gamma$ , 5  $\mu$ M), et le sulforaphane (« Sulfo », agoniste de Nrf2, 10  $\mu$ M) sont les témoins positifs. Le témoin négatif ne contient aucune molécule

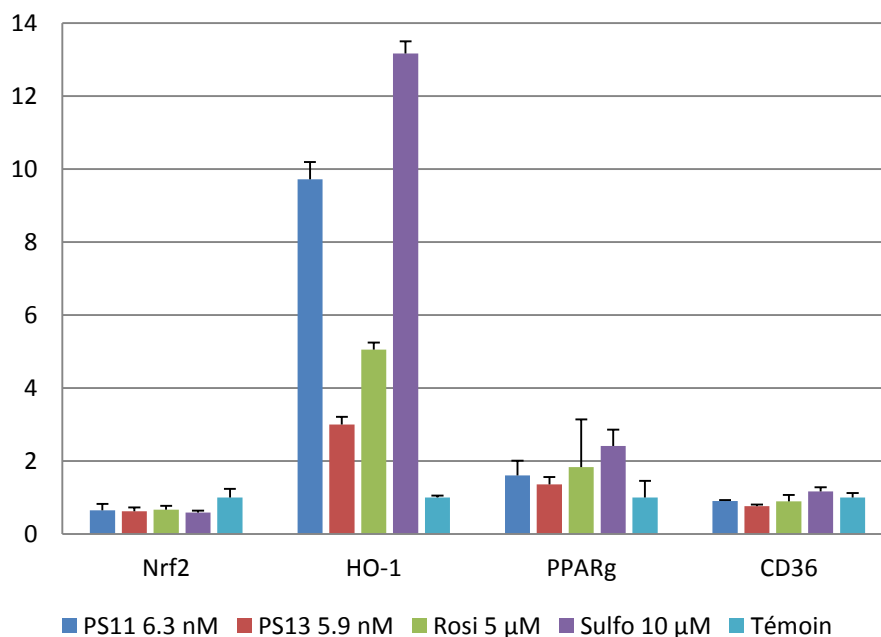
On constate que les composés **PS11** et **PS13** augmentent l'expression du gène codant pour l'enzyme HO-1 à une concentration voisine de 6 nM, par rapport au témoin négatif. Les effets obtenus pour **PS11** (niveau d'expression de l'ARNm de Hmox1 = 12,5) à cette concentration apparaissent être du même ordre que ceux obtenus pour le sulforaphane (11,2), un agoniste de Nrf2. Le sulforaphane ayant été testé à une concentration de 10  $\mu$ M, cela signifie que le composé **PS11** est aussi actif que le témoin positif à des concentrations près de 1700 fois inférieures. Le composé **PS13** semble moins actif (niveau d'ARNm de Hmox1 = 9,6), mais il est aussi un peu moins concentré que **PS11**. Enfin, aucun effet n'est observé pour

les deux composés quant à l'expression du gène Nrf2 lui même. Cela signifie qu'ils n'augmentent pas l'expression du gène mais semblent agir par activation du facteur de transcription Nrf2. **PS11** ne semble pas avoir d'effet sur l'expression du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  par rapport au témoin négatif et les résultats obtenus pour le composé **PS13** ne permettent pas de conclure du fait d'un écart-type élevé. De même, aucune conclusion ne peut être faite quant à la promotion de l'expression du gène cible CD36, du fait d'écarts-types élevés. On remarque par ailleurs que les effets d'activation de la rosiglitazone, le témoin positif pour les gènes PPAR $\gamma$  et CD36, sont absents dans cette expérience et les suivantes. Ce problème a été identifié plus tard comme résultant d'une détérioration de la substance chimique utilisée comme témoin dans ces analyses, au cours de son stockage, expliquant les mauvais résultats obtenus. L'expérience devra donc être renouvelée en présence d'un nouveau témoin rosiglitazone, efficace.

### VI. 3.1.2 Expression des ARNm par les monocytes transformés en macrophages

Les monocytes/macrophages présentent une plasticité fonctionnelle et passent par plusieurs états de polarisation selon leur microenvironnement (Sierra-Filardi *et al.*, 2010). Cette hétérogénéité phénotypique se répercute dans la diversité de leurs fonctions. Le facteur M-CSF permet d'induire la transformation des monocytes humains en macrophages. Il semble qu'il régule également à la hausse le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (Ricote *et al.*, 1998) et le récepteur scavenger de surface CD36 (Febbraio *et al.*, 2001).

Nous avons donc évalué les effets des composés **PS11** et **PS13** sur la promotion de gènes cibles au sein de macrophages dérivés de monocytes humains. Les résultats obtenus sont présentés à la **Figure 118**. L'axe des ordonnées représente les niveaux d'expression des ARNm des différents gènes étudiés, en fonction des molécules.



**Figure 118 :** Effets du composé **PS11** et **PS13** sur les niveaux d'expression des ARNm de gènes cibles (Nrf2, HO-1, PPAR $\gamma$  et CD36) au sein de monocytes différenciés en macrophages après 48 h en présence de M-CSF.

La rosiglitazone (agoniste de PPAR $\gamma$ , 5  $\mu$ M), et le sulforaphane (agoniste de Nrf2, 10  $\mu$ M) sont les témoins positifs. Le témoin négatif ne contient aucune molécule.

Comme dans le cas des monocytes, **PS11** et **PS13** semblent promouvoir l'expression du gène de l'HO-1 par rapport au témoin négatif. Néanmoins, on ne retrouve pas un effet aussi important que dans le cas de monocytes non activés. L'effet maximal obtenu avec le composé **PS11** sur le niveau d'expression de l'ARNm de ce gène est de l'ordre de 9,7 pour les macrophages contre 12,5 pour les monocytes. De même, aucun effet n'est observé sur l'expression du gène CD36 alors que le gène de PPAR $\gamma$  semble très légèrement surexprimé en présence de **PS11**. Etant donné que le facteur M-CSF tend à promouvoir l'expression de PPAR $\gamma$  et CD36, il est étonnant de ne pas observer une régulation à la hausse sur macrophages issus de monocytes humains par rapport aux monocytes. Néanmoins, il est difficile de conclure sans pouvoir comparer avec les effets de la rosiglitazone, par rapport aux monocytes non transformés ; le témoin positif agoniste de PPAR $\gamma$  n'étant pas fiable dans ces expériences.

### VI. 3.2. Expression de CD36 contrôlée par cytométrie de flux

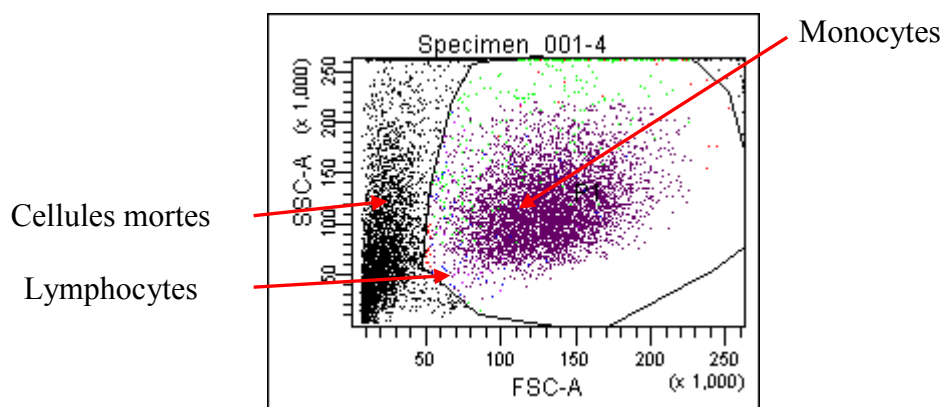
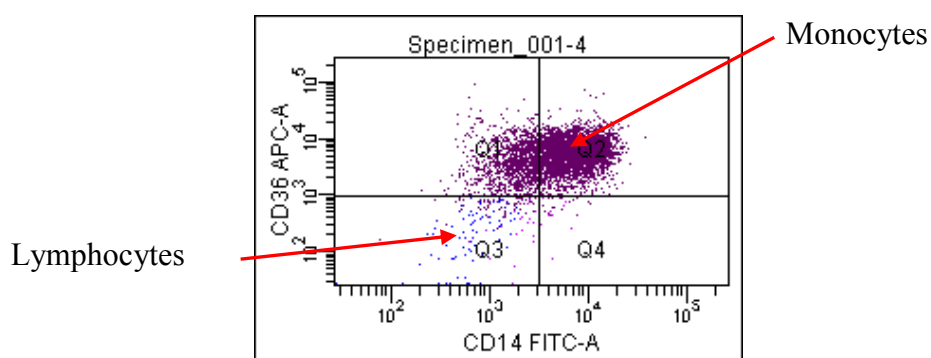
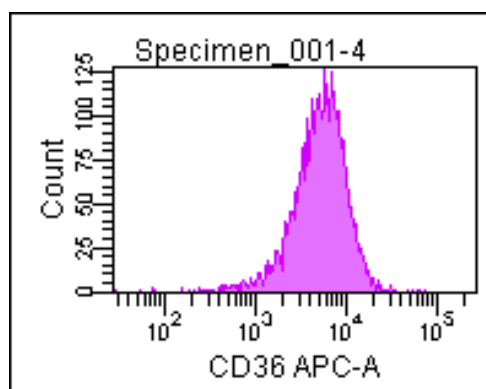
Les tests réalisés par RT-qPCR permettent d'explorer l'expression de certains gènes cibles au sein des monocytes/macrophages, mais ne rendent pas compte de l'effectivité de leur transcription en macromolécules au sein des cellules. Nous avons souhaité vérifier l'expression cellulaire du récepteur d'intérêt CD36 à la surface des monocytes/macrophages par la technique de cytométrie de flux.

La cytométrie de flux permet de mesurer et d'analyser plusieurs caractéristiques physiques de cellules, individuellement. Pour cela, les cellules sont mises en suspension dans un liquide dont le flux est envoyé vers un ou plusieurs faisceaux lumineux qui mesure(nt) les différents paramètres physiques des cellules : leur taille (FSC, Forward Scatter), leur granulométrie (SSC, Side Scatter) et leurs fluorescences relatives (avec deux fluorochromes de couleurs différentes). Les résultats sont donnés sous forme de nuage de points, où chaque point est une cellule, où l'axe des ordonnées représente la granulométrie des cellules (SSC) et l'axe des abscisses leur taille (FSC) (**Figure 119A**). Ces informations permettent ensuite d'identifier au sein du nuage de points la fenêtre correspondant à la sous-population cellulaire d'intérêt (**Figure 119B**). Ces différentes sous-populations peuvent également être séparés par l'appareil (FACS, Fluorescence-activated cell sorting) selon leurs caractéristiques et permettent de donner l'intensité de la fluorescence observée pour chacune d'elles (MFI, Mean Fluorescence Intensity) (**Figure 119C**). A titre d'exemple les résultats obtenus pour le composé **PS11** sont présentés à la **Figure 119**.

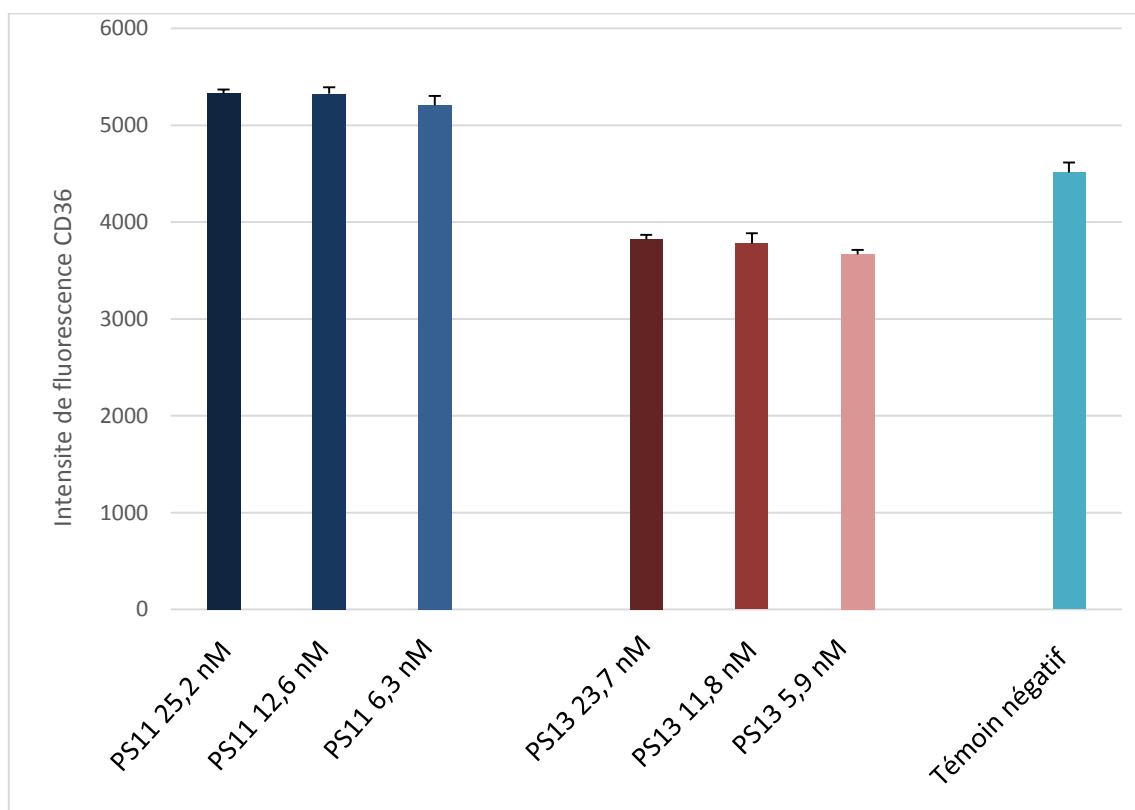
Chaque échantillon de cellules a été testé en simple marquage avec des anticorps anti-CD14 et anti-CD36. L'anticorps anti-CD14 permet de situer le nuage des monocytes, alors que l'anticorps anti-CD36 est le marqueur d'intérêt.

La **Figure 120** résume les résultats obtenus pour les composés **PS11** et **PS13** sur la promotion de l'expression du récepteur CD36 à la surface des macrophages. Trois concentrations infratoxiques comprises entre 6 nM et 25 nM ont été testées afin d'observer l'effet dose des composés.

On constate tout d'abord que **PS11** promeut significativement ( $p < 0,05\%$ ) l'expression cellulaire du récepteur scavenger CD36 par rapport au témoin négatif alors que le composé **PS13** n'a non seulement aucun effet promoteur, mais semble même diminuer son expression par rapport au contrôle négatif. Il apparaît également que la concentration des molécules, comprise entre 6 nM et 25 nM, n'influence pas les résultats obtenus, que ce soit pour **PS11** ou **PS13**. L'effet de ces composés ne semble donc pas être dose-dépendant à ces très faibles concentrations.

**A****B****C**

**Figure 119** : Exemple de nuages cellulaires obtenus par cytométrie de flux, sans marquage pour le composé **PS11** (6,3 nM) (A). Fenêtre du nuage de point correspondant aux monocytes (B) et intensité de la fluorescence des récepteurs CD36 marqués au fluorochrome obtenue pour le composé **PS11** (C)



**Figure 120 :** Intensité de fluorescence du récepteur CD36 marqué au fluorochrome en fonction des différentes concentrations en composés **PS11** et **PS13**.  
Le témoin négatif ne contient aucune molécule.

## VI. 4. Discussion

Sept lactones sesquiterpéniques de type hirsutinolide ont été isolées à partir des différents extraits des parties aériennes de *P. spiralis*. Cinq d'entre elles ont pu être testées pour leurs activités antiprotozoaires.

Deux hirsutinolides, le diacétylpiptocarphol (**PS11**) et la piptocarphine A (**PS13**) sont apparus être les molécules les plus actives sur les deux parasites mais aussi les plus cytotoxiques sur cellules VERO et macrophages murins. Des activités leishmanicides et antipaludiques ont déjà été publiées pour des hirsutinolides dans la littérature (Chea *et al.*, 2006 ; Odonne *et al.*, 2011 ; Pillay *et al.*, 2007). Les lactones sesquiterpéniques sont connues pour présenter fréquemment dans leur structure des motifs accepteurs de Michael, interagissant par addition conjuguée avec des macromolécules nucléophiles (Schmidt, 2006 ; Kupchan *et al.*, 1971 ; Ghantous *et al.*, 2010 ; Merfort, 2011). Il est apparu que la sous-structure 2(5H) furanone était essentielle à l'activité antipaludique des hirsutinolides (Pillay *et al.*, 2007). Plus généralement, Schmidt et collègues ont démontré que les motifs carbonyles  $\alpha,\beta$ -insaturés des STLs sont des pharmacophores clés à la fois pour l'activité



antiprotozoaire et les propriétés cytotoxiques de cette classe de métabolites secondaires, sans avoir pu mettre en évidence de sélectivité (Schmidt, 2006 ; Schmidt *et al.*, 2009). Il n'est donc pas surprenant d'observer une certaine toxicité vis-à-vis des cellules saines de la part des composés isolés dans ce travail. Cela explique également les effets biologiques plus importants observés pour le composé méthacrylé **PS13**, le seul possédant un deuxième motif accepteur de Michael dans sa structure. L'estérification des hydroxyles en position 8 et 13 semble également être importante pour l'activité biologique des hirsutinolides sur les parasites et cellules VERO, puisque les composés **PS15** et **PS16** sont les composés les moins actifs et que le piptocarphol (**PS17**) n'exerce pas d'effets biologiques. Cette corrélation semble beaucoup moins marquée en ce qui concerne la cytotoxicité des molécules sur macrophages.

Deux des hirsutinolides isolés (**PS9** et **PS11**) ont déjà été isolés précédemment de l'espèce médicinale *Pseudelephantopus spicatus*, traditionnellement utilisée au Pérou dans le traitement de la leishmaniose. Ces deux molécules ont été testées *in vitro* pour leur potentiel leishmanicide à l'égard d'amastigotes axéniques de *Leishmania amazonensis* (Odonne *et al.*, 2011). Une excellente activité leishmanicide proche de celle exercée par l'amphotéricine B ( $CI_{50} = 0,41 \mu M$ ) avait alors été retrouvée pour ces deux composés, avec des valeurs de  $CI_{50}$  de  $0,37 \mu M$  (**PS9**) et  $0,20 \mu M$  (**PS11**). L'hirsutinolide **PS9** n'a pas pu être testé pour son activité biologique dans ce travail, du fait de sa dégradation. Néanmoins le composé **PS11** est apparu plus de 20 fois moins actif sur les formes amastigotes axéniques de *L. infantum* par rapport à *L. amazonensis*. Ce résultat peut être dû à des variations de sensibilités des différentes espèces de *Leishmania* à l'égard des molécules (Croft *et al.*, 2006 ; Morais-Teixeira *et al.*, 2011). Un résultat similaire avait été obtenu lors du criblage de l'extrait éthanolique qui semblait plus sélectif vis-à-vis de *Leishmania amazonensis* (II.1.2). Odonne et collègues ont suggéré que les composés **PS9** et **PS11** constituaient de bons agents leishmanicides en se basant sur les excellents résultats obtenus pour ces composés sur *L. amazonensis* et l'absence de cytotoxicité sur certaines cellules tumorales mammifères, reportée dans la littérature (Buskuhl *et al.*, 2010). Néanmoins, l'évaluation de la cytotoxicité des composés sur les cellules hôtes des parasites est un point majeur pour assurer la sélectivité d'une activité pharmacologique. En considérant la faible sélectivité du composé **PS11** présenté dans ce travail de thèse - au regard de sa cytotoxicité sur macrophages - nous pensons que le potentiel leishmanicide du composé **PS11**, au moins, doit être réévalué.

Les premiers tests de criblage réalisés sur les différents extraits des parties aériennes de la plante indiquaient une bonne activité antipaludique pour l'extrait aqueux ( $CI_{50} = 3,0 \mu g/mL$ ) et une activité modérée pour l'extrait éthanolique ( $CI_{50} = 21,1 \mu g/mL$ ). Concernant l'activité leishmanicide, les premiers essais de criblage des extraits éthanoliques sur amastigotes axéniques de *Leishmania amazonensis* étaient très encourageants avec des valeurs de  $CI_{50}$  très basses ( $0,2$  à  $2,2 \mu g/mL$ ). Ces effets leishmanicides n'ont cependant pas été retrouvés vis-à-vis de l'espèce *L. infantum* ( $CI_{50} > 50 \mu g/mL$ ). Enfin, l'extrait aqueux obtenu présentait une bonne activité sur *L. infantum* ( $CI_{50} = 13,4 \mu g/mL$ ) bien que moins importante que celle obtenue sur le parasite *P. falciparum*.

Les activités antiprotozoaires du diacétylpiptocarphol (**PS11**) et de la piptocarphine A (**PS13**) sont certainement en partie responsables des activités biologiques des extraits des parties aériennes de *P. spiralis*, dans la mesure où ils ont été isolés à partir de ces deux extraits. Ces effets s'accompagnent également d'une cytotoxicité importante à la concentration inhibitrice 50, sur lignées cellulaires saines, dont les macrophages. Plusieurs études ont déjà fait état de la cytotoxicité des hirsutinolides sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (Huo *et al.*, 2008 ; Liao *et al.*, 2012 ; Yang *et al.*, 2007 ; Buskuhl *et al.*, 2010 ; Youn *et al.*, 2014). Les résultats biologiques publiés pour les mêmes composés que ceux isolés de *P. spiralis* ont été reportés dans le **Tableau 27**. Ces composés semblent sélectifs vis-à-vis des lignées cellulaires leucémiques (P388 et HL60) comme cela a déjà été décrit dans la littérature pour les lactones sesquiterpéniques, plus généralement (Gach et Janecka, 2014). Buskuhl et collègues ont également évoqué un risque de génotoxicité pour les composés **PS9** et **PS11** d'après des premiers essais réalisés *in vitro* (Buskuhl *et al.*, 2010). Les auteurs précisent néanmoins que ces tests sont préliminaires et ne peuvent être directement corrélés à une génotoxicité ou une mutagénicité *in vivo*. Des essais complémentaires doivent donc être réalisés afin de confirmer ou infirmer ce risque.

L'une des possibilités envisagées pour réduire le risque de liaisons non spécifiques des STLs avec des cibles biologiques non-désirées pourrait être la synthèse de prodrogues comme cela a été suggéré par Woods et collègues (Woods *et al.*, 2013). Les auteurs proposent en effet la formation de dérivés amino à partir de la fonction énone réactive, afin de masquer cette dernière, dans un premier temps. Ils ont réussi à former ces dérivés pour plusieurs lactones sesquiterpéniques présentant une  $\gamma$ -lactone avec un méthylène exocyclique en  $\alpha$  (**Figure 121**). D'après cette étude, certains dérivés amino formés présentent des activités biologiques *in vitro* ou *in vivo* similaires ou plus importantes que le composé de référence. D'une part la formation de ces dérivés permet d'augmenter leur solubilité et d'améliorer leur profil pharmacocinétique. D'autre part le groupement amino protecteur semble pouvoir être éliminé par bioactivation et régénérer l'accepteur de Michael, comme cela a été clairement démontré dans le cas d'un dérivé amino du parthenolide (Hwang *et al.*, 2006). Dans le cas des aminoparthenolides, il a également été établi que cette conversion était promue par la présence de glutathion au sein de la cellule (Woods *et al.*, 2013). L'application de ces prodrogues de STLs doit encore faire ses preuves mais constitue néanmoins une perspective intéressante pour leur application clinique. Cette technique pourrait tout à fait être appliquée aux hirsutinolides.

**Tableau 27** : Activités biologiques des composés isolés de *P. spiralis* sur différentes lignées cellulaires, publiées dans la littérature

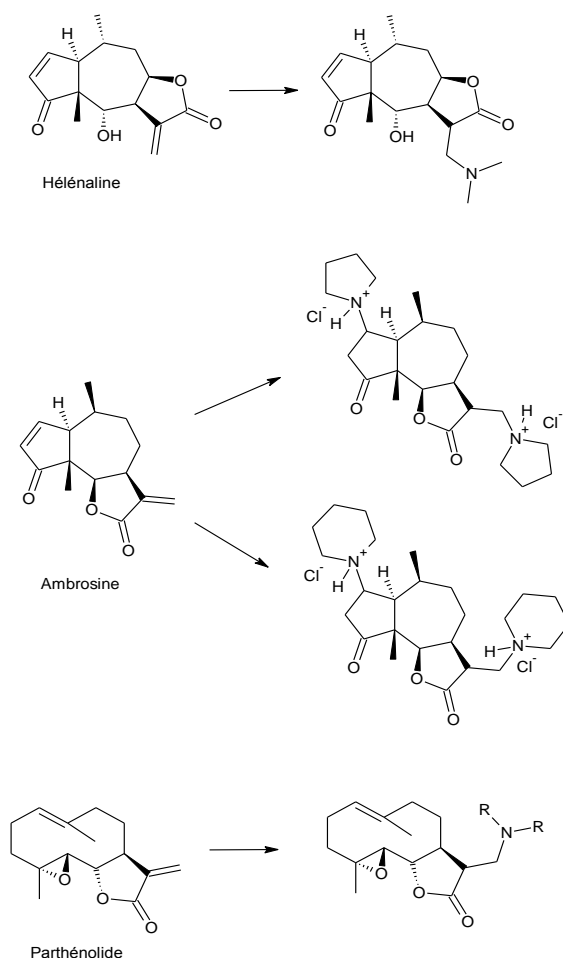
Composés	CI <sub>50</sub> (μM)	CI <sub>50</sub> (μM)	CI <sub>50</sub> (μM)	CI <sub>50</sub> (μM)	CI <sub>50</sub> (μM)	ED <sub>50</sub> (μg/mL)	Index thérapeutique	CI <sub>50</sub> (μM) HL60	CI <sub>50</sub> (μg/mL)	CI <sub>50</sub> (μg/mL)	CI <sub>50</sub> (μg/mL)	CI <sub>50</sub> (μg/mL)
	HeLa	L929	B16F10	P388	A549	KB9	P388 <i>in vivo</i>		Hep3B	MCF7	HepG2	MDA-MB-231
PS9	58,5 <sup>a</sup>	>100 <sup>a</sup>	>100 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PS11	>100 <sup>a</sup>	>100 <sup>a</sup>	>100 <sup>a</sup>	0,73 <sup>b</sup>	NA <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-
PS13	-	-	-	0,77 <sup>b</sup>	NA <sup>b</sup>	7,80 <sup>c</sup>	122 (pour 4 mg/ml) <sup>c,*</sup>	3,87 <sup>d</sup>	-	-	-	-
PS14	-	-	-	1,32 <sup>b</sup>	NA <sup>b</sup>	3,20 <sup>c</sup>	-	5,69 <sup>d</sup>	-	-	-	-
PS15	-	-	-	-	-	2,20 <sup>c</sup>	-	-	> 5 <sup>e</sup>	> 5 <sup>e</sup>	> 5 <sup>e</sup>	> 5 <sup>e</sup>
PS16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mélange d'isomères en C8*de PS17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,20 <sup>f</sup>	16,48 <sup>f</sup>	14,71 <sup>f</sup>
paclitaxel	2,5 <sup>a</sup>	8,62 <sup>a</sup>	6,85 <sup>a</sup>									

<sup>a</sup> (Buskuhl *et al.*, 2010b), <sup>b</sup> (Huo *et al.*, 2008), <sup>c</sup> (Cowall *et al.*, 1981), <sup>d</sup> (Liao *et al.*, 2012), <sup>e</sup> (Y.-L. Yang *et al.*, 2007), <sup>f</sup> (Issa *et al.*, 2006)

\* Index Thérapeutique : l'activité *in vivo* est significative lorsque l'index thérapeutique (T/C) ≥ 130 (Cowall *et al.*, 1981)

NA: non actif

**Lignées cellulaires** : **HeLa** : adénocarcinome humain du col utérin ; **L929** : fibroblastes murins ; **B16F10** : mélanome murin ; **P388** : lymphome murin ; **A549** : adénocarcinome pulmonaire humain ; **KB9** : carcinome humain du nasopharynx ; **HL60** : Leucémie promyélocytaire humaine ; **Hep3B** : carcinome hépatocellulaire humain ; **MCF7** : adénocarcinome humain du sein et des glandes mammaires ; **HepG2** : carcinome hépatocellulaire humain ; **MDA-MB-231** : adénocarcinome humain du sein et des glandes mammaires



**Figure 121** : Exemple de dérivés amino de STLs formés par Woods *et al.*

Les deux composés les plus actifs (**PS11** et **PS13**) ont été testés pour leurs effets sur l'activation de deux voies de transcription au sein des monocytes/macrophages : la voie Nrf2 et PPAR $\gamma$ . Les deux hirsutinolides présentent la même structure à la différence près que la piptocarphine A (**PS13**) possède un motif AM supplémentaire par rapport à **PS11**. Les essais biologiques ont été réalisés à une concentration infratoxique de 6 nM sur l'expression de différents gènes cibles et sur la synthèse du récepteur scavenger CD36 à la surface des monocytes/macrophages.

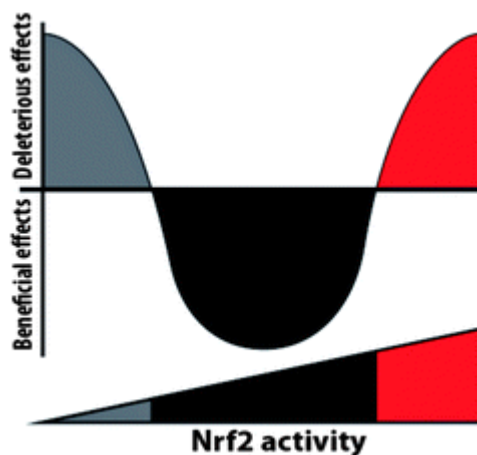
Les deux composés testés promeuvent l'expression du gène de l'Hème Oxygénase 1 (HO-1), au sein des monocytes et des macrophages dérivés de monocytes humains. Le diacétylpiptocarphol (**PS11**) est le composé le plus actif. Il augmente l'expression du gène codant pour l'HO-1 (Hmox1) avec la même intensité que le sulforaphane, mais à une concentration 1700 fois inférieure. Les deux composés n'ont aucun effet sur l'expression du gène Nrf2 lui-même. Certaines lactones sesquiterpéniques, comme le parthénolide, ont déjà été identifiées comme des promoteurs du gène Hmox1 à des concentrations de l'ordre de 10  $\mu$ M (Umemura *et al.*, 2008 ; Wu *et al.*, 2010). Le gène de l'HO-1 est un gène cible de la voie Keap1-Nrf2-ARE. Dans le cas des STLs publiés, il a été prouvé que sa surexpression découlait bien de l'activation de cette voie en amont (Umemura *et al.*, 2008 ; Wu *et al.*, 2010). Par ailleurs, tous ces composés présentent dans leur structure au moins un système

carbonylé  $\alpha,\beta$ -insaturé, susceptible d'interagir *via* addition de Michael, avec Keap1 notamment, libérant Nrf2. Ces premiers résultats semblent donc indiquer que les composés **PS11** et **PS13** pourraient, comme le sulforaphane, être des activateurs de la voie Keap1-Nrf2-ARE, expliquant la surexpression du gène Hmox1. Ces effets pourraient être dus à une addition de Michael ayant lieu entre ces molécules et Keap1, induisant la libération de Nrf2. Afin de confirmer cette hypothèse, il faudrait comparer les effets des composés *in vivo* sur modèles murins de phénotype "sauvage" et des modèles génétiquement modifiés invalidés pour le gène Nrf2. Si une surexpression du gène de HO-1 apparaît dans le premier cas mais pas dans le second, cela confirmera que l'effet est bien dû à une activation de Nrf2. Par ailleurs, il serait intéressant de tester les effets de ce composé (à concentration infratoxique) sur modèles murins impaludés, afin d'évaluer l'évolution de la gravité de la maladie, notamment la survenue d'un neuropaludisme. De même, il serait intéressant de procéder à des tests *in vivo* sur des modèles parasités par des Trypanosomes et vérifier les niveaux de parasitémies.

Les macrophages dérivés de monocytes humains mis en présence de **PS11** semblent surexprimer légèrement le récepteur PPAR $\gamma$  par rapport au témoin négatif. Dans les autres cas, aucun effet n'est observé. En ce qui concerne la promotion du récepteur scavenger CD36, les résultats obtenus par RT-qPCR n'étaient pas concluants, mais la technique de cytométrie de flux a permis de mettre en évidence une surexpression du récepteur à la surface des monocytes/macrophages, en présence de **PS11** seulement, par rapport au témoin négatif. Dans ce cas, le récepteur scavenger CD36 a été testé en tant que cible de PPAR $\gamma$ . **PS11** pourrait donc également constituer un ligand de ce récepteur nucléaire, comme c'est le cas d'autres STLs (Lin, 2012 ; Zou *et al.*, 2008). Il serait intéressant de poursuivre par des tests *in vivo* réalisés sur modèles murins. Ce composé semblant activer à fois la voie Nrf2 et PPAR $\gamma$ , on peut s'attendre à ce qu'il induise l'expression cellulaire de CD36 en conditions normales comme en conditions inflammatoires. Il est donc très possible qu'il permette d'augmenter la clearance du *Plasmodium* chez des modèles murins impaludés. Les résultats obtenus pour **PS13** semblent indiquer, étonnamment que ce composé inhibe l'expression du récepteur, cela doit être confirmé par de nouvelles analyses.

Plus généralement, il est étonnant que le composé le plus actif soit le composé ne présentant qu'un seul motif accepteur de Michael (**PS11**), alors que dans le cas des tests antiparasitaires, la piptocarphine A (**PS13**) exerçait l'effet le plus important. Cela est d'autant plus suprenant que l'équipe d'Umemura a observé une corrélation entre la stimulation de la voie Keap1-Nrf2-ARE et le nombre de systèmes AM présents dans les STLs (Umemura *et al.*, 2008). Néanmoins, lors des tests d'activités antiprotozoaires des molécules, il était apparu que l'absence d'estérification des positions 8 et 13 entraînait une perte d'activité nette sur les modèles cellulaires testés, sauf dans le cas des macrophages. La cytotoxicité était alors importante pour toutes les molécules testées. Cela peut laisser supposer une certaine sélectivité du noyau hirsutinolide vis-à-vis des macrophages et peut-être des mécanismes d'interactions distincts par rapport aux autres lignées cellulaires ou parasites. Sachant que le

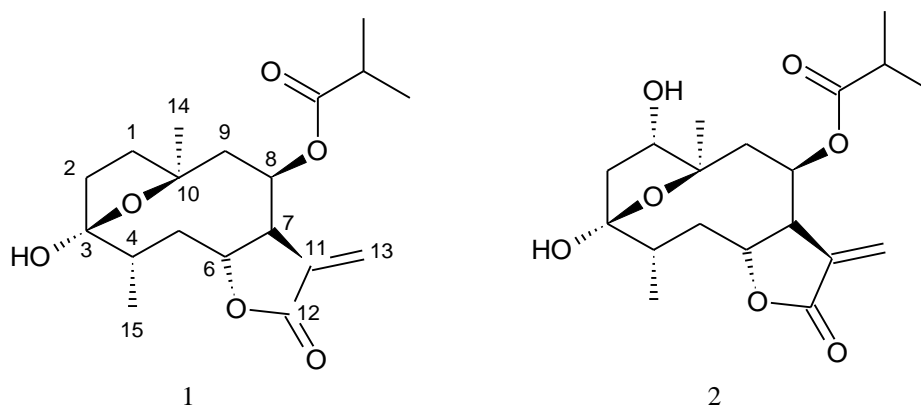
facteur de transcription Nrf2 a une nature hormétique<sup>16</sup> (**Figure 122**) (Kumar *et al.*, 2014), on peut penser qu'une concentration très élevée en activateur - dans le cas présent, en hirsutinolide - puisse entraîner sa "suractivation" et donc une toxicité pour le macrophage alors qu'à une concentration moindre, restant à déterminer, son niveau d'activation puisse avoir des effets bénéfiques.



**Figure 122** : Nature hormétique du facteur de transcription Nrf2 (figure issue de Kumar *et al.*, 2014)

En ce qui concerne les STLs identifiées comme des ligands du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (Lin, 2012 ; Zou *et al.*, 2008), le travail de Lin est intéressant puisqu'il porte sur des molécules ayant des structures proches des hirsutinolides isolés dans ce travail (**Figure 123**). Dans ces travaux, les composés 1 (tirotundine) et 2 (tagitinin A) ont été identifiés comme des ligands de PPAR $\gamma$ . L'auteur a réalisé des simulations de docking afin d'étudier les liaisons de ces deux molécules avec les acides aminés de la poche du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . Il s'avère que, pour les deux molécules, le carbonyle du résidu isobutyrate en position 8 et l'hydroxyle en position 3 participent à la formation de liaisons hydrogènes, soit directement avec les acides aminés de la poche, soit par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. On peut penser, étant donné la structure proche des hirsutinolides isolés, que des interactions similaires peuvent avoir lieu avec les carbonyles des substituants et/ou les hydroxyles libres du macrocycle.

<sup>16</sup> Définition de l'hormésie : phénomène au cours duquel un agent environnemental induit des effets contradictoires à différentes doses. En général, un effet stimulant et bénéfique est observé à faible concentration alors que des doses plus élevées conduisent à une inhibition et/ou une toxicité (Kumar *et al.*, 2014).



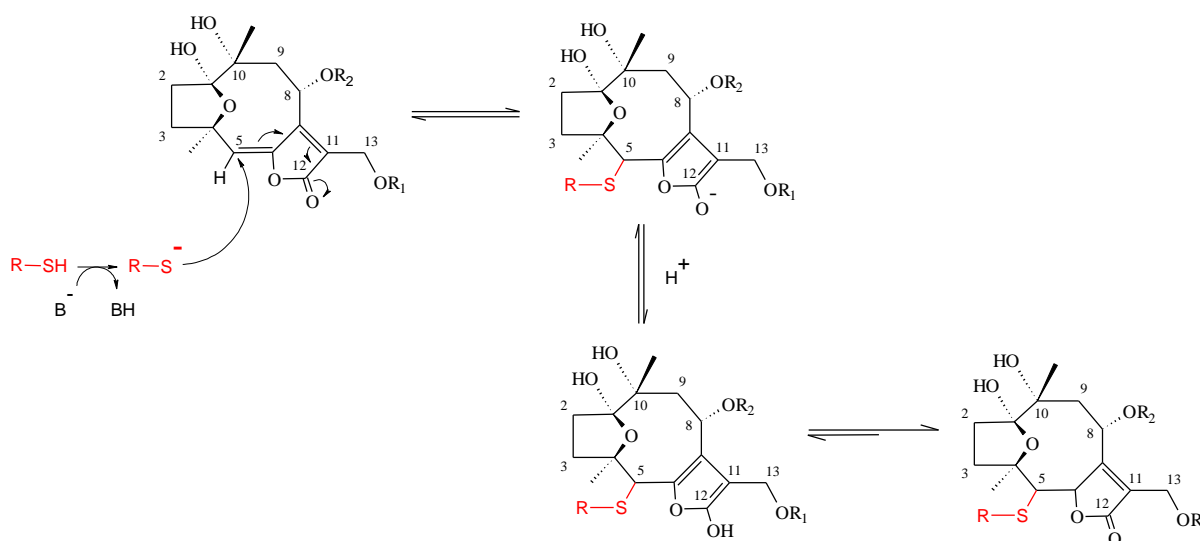
**Figure 123** : Structures des STLs isolées de *Tithonia diversifolia*, Asteraceae (Lin, 2012)

Un autre élément intrigant est l'absence d'effet dose pour le composé **PS11** quant à l'expression du récepteur CD36 à la surface des monocytes/macrophages pour trois concentrations différentes (6, 12 et 25 nM). Jusqu'à présent, les STLs citées plus haut, soit ligands de PPAR $\gamma$  soit activatrices de la voie Nrf2, présentaient des effets dose-dépendants. Néanmoins, ces composés étaient aussi généralement testés à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Umemura a fait une observation intéressante concernant l'activité d'une lactone sesquiterpénique, la calealactone A. Ce composé a été identifié par les auteurs comme le composé le plus actif sur l'activation de la voie Nrf2-ARE à 10  $\mu$ M, par rapport à d'autres STLs. Ils ont testé ce même composé à deux concentrations (0,2 et 0,5  $\mu$ M) pour lesquelles l'effet du composé est à la fois minimal (proche de l'effet du témoin négatif) et identique. Les auteurs ont prétraité les cellules neuronales murines à ces deux concentrations avant d'ajouter ensuite du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induisant un stress oxydant. Ils ont alors observé une induction de HO-1 et une activation de Nrf2-ARE en réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, à des concentrations en composé induisant normalement un effet minimal sur Nrf2-ARE. L'administration de calealactone A et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exerce donc un effet qui est synergique, mais non additif. Cela signifie que l'effet est plus important pour la concentration en STL de 0,5  $\mu$ M par rapport à 0,2  $\mu$ M, alors que l'effet initial était le même pour les deux concentrations. Ce test est très intéressant et montre l'intérêt de tester les molécules en conditions de stress ou en conditions inflammatoires. Cela serait intéressant de réaliser ce type d'expérience avec les composés **PS11** et **PS13**, d'autant que leurs effets sur l'induction du gène Hmox1 sont loin d'être minimaux à des concentrations plus faibles encore que la calealactone A.

Même s'il n'existe pas à ce jour d'études de relation structure/activité poussées concernant les hirsutinolides, nous pensons qu'ils sont susceptibles d'être impliqués dans une réaction d'addition de Michael au niveau du carbone tertiaire en position C-5 du macrocycle. Ce mécanisme d'action est rendu possible par la présence d'un système conjugué étendu butadiénolide, comme présenté à la **Figure 124**. Cette hypothèse a déjà été proposée par d'autres auteurs pour expliquer la réactivité biologique de ce type de STLs (Cowall *et al.*, 1981 ; Kos *et al.*, 2006). Par ailleurs, le fait que le composé **PS11** soit plus actif que le

composé **PS13** sur la voie de transcriptions Nrf2 et l'expression de CD36 suggère que d'autres phénomènes entrent en jeu. Ces phénomènes peuvent être des interactions avec les sites actifs *via* des liaisons hydrogènes ou bien encore être dûs à un encombrement stérique différent.

Quoi qu'il en soit les résultats obtenus pour le diacétylptocarphol (**PS11**) sur la stimulation des monocytes/macrophages sont vraiment encourageants. Il semble qu'il constitue un activateur de Nrf2. Différentes concentrations doivent être testées sur différents modèles *in vitro* et *in vivo*, simulant des phénotypes proinflammatoires et antiinflammatoires afin de mieux comprendre les voies activées par ce composé et son potentiel thérapeutique. Par ailleurs, les autres hirsutinolides, surtout ceux qui présentent des hydroxyles libres dans leurs structures - et donc une moindre cytotoxicité - doivent être testés, de même que l'influence d'un deuxième motif AM au sein de la structure.



**Figure 124** : Mécanisme d'addition de Michael proposé pour les hirsutinolides

Enfin, les résultats obtenus sur ces deux voies ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'usage traditionnel de *Pseudelephantopus spiralis*. Si l'effet antiparasitaire des molécules est une explication possible, elle apparaît peu satisfaisante étant donné l'absence de sélectivité de ces composés. Il est par contre tout à fait possible que leurs effets soient dirigés vers la réponse immunitaire de l'hôte plutôt que vers les parasites eux-mêmes. Cela validerait l'usage de cette plante dans le traitement du paludisme mais aussi en tant qu'antiinflammatoire, plus généralement.

Les molécules décrites ici sont extractibles par l'eau bouillante. En médecine traditionnelle, une décoction de la plante est préparée et administrée par voie orale ou en bain. La "règle de cinq" établie par Lipinski permet de prédire l'absorption de ces molécules de façon simple (Schmidt, 2006 ; Lipinski, 2000). Si ces 5 points sont vérifiés pour un composé, alors il aura une bonne absorption par voie orale (les résultats sont donnés entre parenthèses pour **PS11**) :



- Nombre de donneurs de liaisons hydrogènes (groupements NH ou OH) <5 (**2**)
- Nombre d'accepteurs de liaisons hydrogènes (somme des atomes d'azote et d'oxygène) < 10 (**9**)
- Poids moléculaire < 500 g/mol (**M= 396 g/mol**)
- Log de P calculé lors d'un partage octanol/eau <5,0 (**log P<sup>17</sup><sub>(25°C)</sub>= -1,6**)
- Exceptions (transport actifs etc...) (**inconnu**)

Le composé **PS11** semble avoir, *a priori*, une bonne biodisponibilité orale et est donc susceptible d'être distribué de façon systémique. Par ailleurs un passage *per-cutané* est possible étant donné sa lipophilie. Une activation de la voie Nrf2 par voie cutanée a déjà été démontrée, *in vivo*, sur un modèle murin, pour un sesquiterpène monocyclique présentant un motif AM, la zérumbone (Shin *et al.*, 2011). Les hirsutinolides seraient donc tout à fait capables de passer la barrière cutanée lors des bains et être résorbées *per os*. Ces points mériteraient cependant d'être vérifiés. Par ailleurs, étant donné la cytotoxicité de ces molécules à des concentrations de l'ordre du micromolaire, de nouveaux tests, notamment *in vivo*, devraient être réalisés pour s'assurer de l'innocuité de la préparation traditionnelle.

---

<sup>17</sup> D'après Scifinder



## **Partie C- CONCLUSION ET PERSPECTIVES –**



L'étude phytochimique de *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist (Asteraceae), réalisée lors de ce travail avait pour objectif principal d'isoler des lactones sesquiterpéniques à visées antiparasitaires. Ces molécules sont en effet connues pour posséder au moins un motif accepteur de Michael dans leur structure. Le potentiel antiparasitaire des molécules isolées lors de ce travail a été étudié en suivant deux approches. La première concerne l'évaluation de l'activité biologique des extraits et des composés isolés par des tests *in vitro* sur deux parasites protozoaires, appartenant aux genres *Leishmania* et *Plasmodium*. Le second traite de l'évaluation de la capacité des molécules isolées à polariser les monocytes/macrophages, pouvant ainsi exercer leur activité antiparasitaire de façon indirecte, par stimulation de la réponse immunitaire innée de l'hôte. L'étude a porté plus particulièrement sur l'activation des voies de transcription Keap1-Nrf2-ARE et PPAR $\gamma$  afin d'induire l'expression du récepteur « scavenger » CD36 à la surface des macrophages. En effet, les macrophages exprimant ce récepteur sont capables de reconnaître et de phagocyter les érythrocytes parasités par *Plasmodium*. L'activation de la voie Nrf2 a été appréciée d'après les niveaux d'expression d'un de ces gènes cibles, le gène codant pour l'enzyme Hème Oxygénase (HO-1). Cette enzyme permet de réduire la gravité du paludisme et des trypanosomiasés chez des modèles murins parasités et exerce aussi des propriétés cytoprotectrices vis-à-vis du stress oxydant.

Au cours de cette étude, nous nous sommes également intéressés de manière approfondie aux données spectrales des lactones sesquiterpéniques isolées. Une partie de ce travail a donc été consacrée à la compréhension de leurs spectres de RMN et à l'optimisation de leur enregistrement. Ces composés ont également été étudiés par spectrométrie de masse haute résolution et une méthode de couplage UHPLC-DAD-HRMS-ESI(+) a été mise au point afin de permettre leur détection et leur identification au sein de mélanges complexes grâce à la détection d'ions diagnostiques issus de leur fragmentation en MS/MS et MS<sup>n</sup>.

En travail préliminaire, l'étude micrographique du fruit et de la feuille de *P. spiralis* a été réalisée et fournit des éléments pour une identification fiable de la drogue végétale.

Le fractionnement bioguidé des différents extraits des parties aériennes de *P. spiralis* a conduit à l'isolement de 8 composés déjà décrits dans la littérature mais nouvellement décrits dans cette espèce : le  $\beta$ -stigmastérol (**PS1**) et 7 lactones sesquiterpéniques (**PS9** à **PS17**) ayant en commun un même noyau structural de type hirsutinolide. Ce groupe chimique, appartenant aux lactones sesquiterpéniques de type germacranolides, est caractéristique de la tribu des Vernoniaeae. Les composés **PS9**, **PS11**, **PS15** et **PS17** ont déjà été isolés à partir de la seule autre espèce du genre *Pseudelephantopus*, *P. spicatus*.

Les différents procédés d'extractions et de fractionnement utilisés nous ont permis de proposer une méthode d'obtention optimisée pour ces molécules. En effet, une extraction aqueuse à reflux permet d'extraire ces composés lipophiles avec de meilleurs rendements qu'un solvant organique et permet donc d'envisager la mise en place de protocoles d'extraction à plus grande échelle, respectant les critères de la chimie verte.

L'élucidation structurale des hirsutinolides par spectrométrie de RMN s'est révélée être un processus long et délicat eu égard à la flexibilité conformationnelle du noyau macrocyclique, entraînant un élargissement et donc un manque de résolution des signaux en RMN  $^1\text{H}$ . On constate également l'absence de certains signaux en RMN  $^{13}\text{C}$ , dans des conditions normales d'enregistrement et dans un solvant usuel tel que le  $\text{CDCl}_3$ . Les spectres de RMN à deux dimensions NOESY n'ont pas permis d'établir la configuration relative des molécules qui a dû être déterminée par comparaison avec les données de RMN publiées dans la littérature. Cela a permis de mettre à jour certaines incohérences de la littérature concernant la structure tridimensionnelle des hirsutinolides.

Pour pallier ces problèmes, nous avons démontré que les spectres obtenus dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  présentaient des signaux protons et carbones mieux résolus, même à température ambiante. La qualité est encore améliorée en réalisant les analyses à haute température. De plus, les données de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ainsi obtenues présentent l'avantage d'être comparables, à deux exceptions près (H-5 et H-8), avec celles acquises dans le  $\text{CDCl}_3$ , le solvant généralement utilisé pour l'enregistrement des spectres des hirsutinolides dans la littérature. Il a également été mis en évidence que les hirsutinolides hydroxylés en position 8 (**PS15**, **PS16** et **PS17**) présentent deux conformères dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ , le plus probablement dû à la rupture partielle d'une liaison hydrogène intramoléculaire. Cette dernière est formée dans un solvant aprotique, entre l'hydrogène de l'hydroxyle en C-8 et l'oxygène du pont éther-oxyde entre C-1 et C-4. En ayant connaissance de ces faits, le  $\text{CD}_3\text{OD}$  apparaît donc être un excellent compromis pour l'étude structurale des hirsutinolides par RMN.

Ces composés ont également été analysés par MS et UHPLC-MS de manière exhaustive. Les schémas de fragmentation ont été établis par HRMS<sup>n</sup> pour les deux ions majoritaires formés dans la source ESI suite à leur analyse par UHPLC-DAD-HRMS. Plusieurs ions fragments diagnostiques ont été identifiés, pour le noyau de base des hirsutinolides ainsi qu'en fonction des substituants  $\text{R}_1$  et  $\text{R}_2$ , permettant ainsi de prédire leurs structures. Ces données ont permis de dérépliquer, par UHPLC-DAD-HRMS/MS, la fraction méthanolique D4 obtenue à partir d'un extrait éthanolique des parties aériennes de *P. spiralis* pour son contenu en lactones sesquiterpéniques. Ainsi, il a été montré que cette fraction contenait les 7 molécules précédemment isolées dans ce travail, ainsi que deux autres hirsutinolides. Pour ces derniers composés, deux structures ont été proposées sur la base de leur profil de fragmentation, correspondant aux composés déjà connus (1*S*\*,4*R*\*,8*S*\*,10*R*\*)-13-acétyloxy-1,4-époxy-1,10-dihydroxy-8-isobutyryloxygermacra-5*E*,7(11)-dièn-6,12-olide et la piptocarphine B ou son isomère en C-1. Il serait intéressant de pouvoir isoler ces composés et de confirmer leurs structures par des analyses en RMN 1D et 2D. Cette analyse LC-MS a également permis d'établir le comportement chromatographique particulier des hirsutinolides ayant une fonction OH libre en position 8 (**PS15**, **PS16** et **PS17**), présentant des pics chromatographiques dédoublés lorsque la phase mobile utilisée contient un acide. Ce phénomène peut être attribuable à la rupture partielle de la liaison hydrogène intramoléculaire de ces composés, dans de telles conditions, et corrobore ainsi l'existence de deux conformères lorsque ces molécules sont en solution dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Les extraits éthanoliques et aqueux préparés à partir des parties aériennes de *P. spiralis* ont été testés pour leurs activités leishmanicide et antipaludique. Ils se sont révélés être plus actifs vis-à-vis de l'espèce *Plasmodium falciparum* que de *Leishmania infantum*, en particulier l'extrait aqueux sur Plasmodies ( $CI_{50}=3 \mu\text{g/mL}$ ). Dans les deux cas, une cytotoxicité importante a été observée sur cellules saines VERO et macrophages ( $CC_{50}< 3 \mu\text{g/mL}$ ).

Les effets des composés isolés **PS11**, **PS13**, **PS15**, **PS16** et **PS17** ont été évalués sur ces deux parasites protozoaires. Les deux hirsutinolides estérifiés en position 8, le diacétylpiptocarphol (**PS11**) et la piptocarphine A (**PS13**), sont les plus actifs sur les deux espèces, mais ne sont pas sélectifs. Généralement, une toxicité importante vis-à-vis des macrophages ( $0,9 \mu\text{M} < CC_{50} < 6 \mu\text{M}$ ) est notée pour l'ensemble des molécules.

L'évaluation de l'activité des composés les plus actifs, **PS11** et **PS13**, sur la stimulation des monocytes/macrophages a donné des résultats très encourageants. Les deux lactones sesquiterpéniques promeuvent, à une concentration voisine de 6 nM, l'expression du gène Hmox-1 codant pour l'enzyme HO-1. Cette surexpression est plus importante dans le cas du diacétylpiptocarphol (**PS11**) et du même ordre que celle induite par le sulforaphane, cela à une concentration 1700 fois inférieure. **PS11**, contrairement à **PS13**, permet également d'augmenter l'expression du récepteur « scavenger » CD36 à la surface des monocytes/macrophages, mais cet effet ne semble pas être dépendant de la dose. Ces résultats sont en faveur d'une activation de la voie Keap1-Nrf2-ARE de la part des deux germacranolides et de la voie PPAR $\gamma$  pour **PS11**. Les hirsutinolides sont susceptibles de subir une addition de Michael au niveau du carbone 5 du cyclodécène. L'induction de la voie Keap1-Nrf2-ARE par ces deux molécules pourrait donc provenir de la formation d'un adduit de Michael avec des résidus cystéines de Keap1, induisant la libération de Nrf2 dans le cytosol et sa translocation dans le noyau. Concernant PPAR $\gamma$ , le diacétylpiptocarphol pourrait établir des liaisons hydrogènes privilégiées avec les acides aminés de la poche du récepteur dont il constituerait alors un ligand.

En perspectives de ce travail, la méthode d'analyse développée par UHPLC-DAD-HRMS-ESI(+) permettra de dérépliquer des extraits obtenus à partir d'autres espèces de Vernoniaeae, en vue de détecter et d'identifier de nouveaux hirsutinolides d'intérêt. Cela se justifie tout particulièrement pour les espèces du genre *Vernonia*, étant donné que les hirsutinolides en sont des marqueurs chimiotaxonomiques (Seaman, 1982) et que ce vaste genre constitue par ailleurs une source importante de plantes médicinales et alimentaires (Toyang et Verpoorte, 2013). Elle permettra également de s'assurer du caractère naturel de cette classe de germacranolides au sein des espèces, en vérifiant leur présence au sein de plusieurs extraits bruts et le cas échéant en étudiant l'influence des différents solvants d'extraction sur leur formation. Il est prévu de réaliser cette analyse prochainement pour *P. spiralis*. La quantification de ces composés dans la décoction traditionnelle permettra également de statuer sur la sécurité de ce remède. Dans la mesure où le genre *Pseudelephantopus* est composé de deux espèces, il serait également intéressant de comparer leurs profils chimiques concernant la composition en hirsutinolides, d'autant qu'elles présentent des usages en médecine traditionnelle distincts.

Du point de vue de l'activité biologique, d'autres essais *in vitro* sont actuellement en cours pour confirmer l'activation des voies Nrf2 et/ou PPAR $\gamma$  par **PS11** et **PS13**, en contrôlant l'expression d'autres gènes, notamment celui du promoteur de Nrf2, par mesure de l'activité luciférase et par PCR, ainsi que l'expression d'autres protéines cibles de ces voies, au sein de cellules humaines embryonnaires de rein HEK 293. Plusieurs concentrations en molécules seront testées pour étudier l'effet dose-réponse. Le potentiel d'activation de ces deux voies par les autres hirsutinolides isolés dans ce travail et les deux nouveaux composés détectés par UHPLC-DAD-HRMS pourra être évalué *in vitro* afin de pouvoir établir des relations structures/activités et notamment observer l'influence d'un deuxième motif accepteur de Michael ou de fonctions hydroxyles libres en position 8 et 13. Des essais *in vivo* sur des modèles murins sont également prévus afin d'observer les effets de ces composés sur l'évolution de la maladie chez des souris impaludées, et de confirmer ou infirmer leur toxicité. Il serait également intéressant d'évaluer, toujours *in vivo*, les effets de ces molécules sur l'évolution des trypanosomiasés chez des souris, puisque ce versant n'a pas pu être étudié lors de ce travail, malgré le potentiel des accepteurs de Michael dans ces parasitoses. Étant donné le large panel d'activités biologiques reportées pour les composés électrophiles, il pourrait également être intéressant d'étudier plus en détails le potentiel des hirsutinolides sur d'autres cibles biologiques, notamment vis-à-vis des lignées cancéreuses leucémiques eu égard à leur cytotoxicité. Enfin, l'hémisynthèse de dérivés amino au niveau du motif électrophile pourrait permettre de réaliser des pro-drogues intéressantes à évaluer quant à leurs activités biologiques et pour améliorer leur sélectivité.

Finalement, les résultats biologiques obtenus tendent à valider l'utilisation en médecine traditionnelle de cette plante dans le traitement de l'inflammation et du paludisme. Les éléments présentés au cours de ce travail nous portent à penser que les effets de la décoction traditionnelle sont bien liés à la présence des hirsutinolides. L'activité pharmacologique semble le plus probablement due à la stimulation des réponses immunitaire et antioxydante induite chez l'Homme par ces accepteurs de Michaël, plutôt qu'aux effets antiparasitaires non sélectifs observés vis-à-vis de *Plasmodium*.

Les résultats de cette étude encouragent donc la poursuite des recherches sur la capacité des molécules électrophiles à activer la réponse immunitaire innée de l'hôte pour lutter contre les parasitoses et plus particulièrement le paludisme.



## **- MATÉRIEL ET MÉTHODES -**



## I. Matériel végétal

### I. 1. Collecte et identification du matériel végétal

Les différents lots de *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist ont été récoltés au Pérou grâce à la présence de l'UMR 152 à Lima et en collaboration avec l'IIAP, institut de recherche localisé à Iquitos, en Amazonie péruvienne. Cinq lots de l'espèce ont été récoltés afin de mener ce travail de recherche.

Les quatre premiers lots (**lots A, B, C et E**) ont été récoltés sur une parcelle de culture identifiée par Elsa Rengifo et Carlos Amasifuen (IIAP) de la réserve nationale protégée Allpahuayo-Mishana, située au niveau du kilomètre 28 de la route joignant Iquitos et Nauta, dans la région du Loreto. Un premier lot (**A**) constitué de la plante entière, en fin de floraison/début de fructification, a été récolté par Pedro Vásquez-Ocmín et Cynthia Girardi en avril 2011. Un exemplaire a été déposé à l'Herbier du Museum National de l'Université de San Marcos à Lima et est en cours de montage. Une deuxième récolte de la plante entière a été effectuée sur la même parcelle en juillet 2011 par Mohamed Haddad (IRD) (**lot B**). Deux autres collectes des parties aériennes ont été réalisées sur la même parcelle aux mois de juillet 2012 (**lot C**) et mai 2013 par Mohamed Haddad (**lot E**).

Les racines, tiges, feuilles et inflorescences ont été séparées. Les premiers tests de screening d'activités biologiques ont été réalisés sur les **lots A et B**, dans le but d'évaluer le potentiel leishmanicide de la plante sur amastigotes axéniques de *Leishmania amazonensis*. L'étude botanique microscopique de la poudre de *Pseudelephantopus spiralis* a également été réalisée sur ces deux premiers lots. L'étude phytochimique de l'espèce et les tests d'activités biologiques découlant ont été réalisés à partir de ces quatre premiers échantillons, provenant tous du même lieu de récolte.

Un cinquième lot (**D**) constitué des parties aériennes de la plante a été récolté par Geneviève Bourdy et Valérie Jullian (IRD) dans le secteur d'Azulis en août 2011 et a été identifié par Hamilton Beltram. Un exemplaire (GB3493) a été déposé à l'Herbier du Museum National de l'Université de San Marcos à Lima au Pérou (UNMSM).

La dérégulation des lactones sesquiterpéniques de type hirsutinolide au sein de *P. spiralis* par UHPLC-DAD-MS/MS a été réalisée à partir du **lot D**.

### I. 2. Préparation des lots

#### I. 2.1. Séchage

Dans un premier temps, les échantillons sont étalés sur une surface plane et séchés à température ambiante et à l'abri de la lumière. Ils sont ensuite introduits dans une étuve à

30°C afin de finaliser de séchage. Les différentes parties des deux premières récoltes (tiges, racines, feuilles, inflorescences) ou les parties aériennes (3 autres récoltes) sont divisées et séchées séparément. Les échantillons sont ensuite réduits en poudre.

### **I. 2.2. Conservation des lots**

Les échantillons secs pulvérisés correspondant à chaque récolte sont conditionnés dans des sacs plastifiés scellés et identifiés, maintenus au sec et à l'abri de la lumière.

### **I. 3. Extraction**

Différents procédés d'extraction ont été utilisés afin d'optimiser les rendements.

#### **➤ Extraction par macération dans l'éthanol**

De faibles quantités des **lots A et B** (tiges, racines, feuilles, inflorescences) sont extraites dans un premier temps en vue d'effectuer les premiers tests d'activité biologique. Ces extraits sont obtenus par macération dans l'éthanol à 96% à température ambiante pendant 2 x 48 h. Ce même protocole d'extraction est également utilisé pour l'extraction de la totalité des **lots C et D**, jusqu'à épuisement de la drogue.

#### **➤ Extractions successives par l'éther de pétrole et l'éthanol**

En vue de l'étude phytochimique de la plante, les deux premières récoltes sont d'abord extraites par de l'éther de pétrole au moyen d'un réacteur en verre de 10 L maintenu sous chauffage à reflux grâce à un système de chauffe ballon Electrothermal CMU12/L, associé à un contrôleur thermique Electrothermal MC-238 et maintenu sous agitation par un agitateur Heidolph RZR-1 et ce jusqu'à épuisement de la drogue. Cette première extraction d'une durée d'environ 2 h a pour but de dégraisser l'extrait. Le marc est ensuite extrait de nouveau par de l'éthanol à 96%, selon le même procédé, durant environ 2 h.

Les extraits obtenus par les deux méthodes citées précédemment sont concentrés à siccité à l'aide d'évaporateurs rotatifs de type Rotavapor® (BÜCHI), modèles R-210 et R-114.

#### **➤ Extraction à l'eau bouillante**

L'extraction du **lot E** est réalisée à l'eau distillée bouillante pendant 10 min afin de correspondre à la préparation traditionnelle de la plante, à l'aide du même système Electrothermal. L'extrait aqueux (4,25 L) est ensuite congelé à -20°C puis lyophilisé durant près de 230 h grâce à un lyophilisateur de type Labconco™ Lyoph-Lock 6™ (7753001).

### **I. 4. Filtration sur charbon actif**

Les fractions sont dans certains cas filtrées sur charbon actif Fisher Chemical, afin d'éliminer les pigments et chlorophylles. La procédure générale consiste à mettre en contact l'échantillon avec 3-4 fois son poids de charbon actif dans un volume en millilitre

correspondant à  $\frac{1}{2}$  ou 1 fois la masse de l'échantillon et à laisser reposer l'ensemble sans agitation. Après que les solutions sont devenues incolores, mais jamais au-delà d'une heure de contact, elles sont filtrées sur filtre nylon 0,45  $\mu\text{m}$  à l'aide d'une seringue et les filtrats sont ensuite concentrés à siccité à l'aide d'évaporateurs rotatifs de type Rotavapor® (BÜCHI), modèles R-210 et R-114.

## **II. Méthodes d'analyse micrographique d'une plante**

### **II. 1. Montage des coupes**

#### **II. 1.1. Préparation des coupes**

Les coupes transversales se font perpendiculairement à l'axe de la feuille, grâce à une lame de rasoir, après avoir incorporé l'échantillon dans un morceau de moelle de sureau préalablement fendu longitudinalement. Une fois réalisées, les coupes sont alors immédiatement plongées dans une solution diluée d'hypochlorite de sodium dans laquelle elles restent en contact pendant au moins 10 min. Elles sont ensuite retirées puis lavées deux fois à l'eau distillée. Les coupes sont ensuite plongées dans un colorant permettant de mettre en évidence les différents tissus, dans lequel elles sont laissées en contact pendant environ 3 min. Elles sont ensuite de nouveau rincées deux fois à l'eau distillée. Enfin chaque coupe transversale est déposée dans une goutte de glycérine, entre lame et lamelle, avant d'être analysée au microscope.

#### **II. 1.2. Colorants et réactifs utilisés**

➤ **Réactif Carmino-vert aluné de Mirande (Mirande 1900) :**

Deux solutions A et B sont préparées et seront ensuite mélangées dans les proportions  $\frac{2}{3}$  (A) et  $\frac{1}{3}$  (B). La solution A contient 140 g d'alun de potassium, 40 g de carmin, et 750 g d'eau distillée. La solution B contient 1 g de vert d'iode et 800 g d'eau distillée.

➤ **Glycérine-gélatinée :**

Une partie de gélatine est mise à fondre dans 6 parties d'eau distillée et 7 parties de glycérol. Le tout est mélangé et additionné de cristal de thymol à des fins de conservation.

### **II. 2. Examen microscopique de la plante pulvérisée**

L'examen microscopique de la plante pulvérisée est réalisé selon le protocole décrit dans la Pharmacopée Européenne 8<sup>ème</sup> Edition (Service européen de la qualité du médicament 2014), section 2.8.23, dans une solution d'hydrate de chloral à 80 g/20 mL d'eau.

Les échantillons sont observés grâce à un microscope de type optique Leica. Les photos des préparations microscopiques sont prises grâce à un appareil photo Canon piloté par le logiciel Canon Utilities Remote Capture Version 2.7.4.23.

### **III. Méthodes de chromatographie**

#### **III. 1. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Les contrôles analytiques des extraits et fractions obtenus sont réalisés en routine par chromatographie sur couche mince.

##### **III. 1.1. Phase stationnaire**

Les supports chromatographiques utilisés sont des plaques de CCM commerciales présentant une phase stationnaire normale, de type Silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck). Il s'agit de plaques d'aluminium de dimensions 20 x 20 cm, recouvertes d'une fine couche de 0,20 mm d'épaisseur de gel de silice, greffée par un fluorochrome absorbant à une longueur d'onde de 254 nm. Le développement des plaques chromatographiques est réalisé dans des cuves de migration en verre saturées par différentes phases mobiles.

##### **III. 1.2. Dépôts des échantillons sur CCM**

En routine, les échantillons sont déposés et concentrés sur les plaques de CCM manuellement grâce à des capillaires de verre de 10 µL de volume. Dans certains cas où une excellente résolution est nécessaire ou bien pour des analyses quantitatives (notamment pour certaines chromatographies récapitulatives), un système de déposeur automatique d'échantillons CCMHP (Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance) de modèle ATS 4 (CAMAG), piloté par le logiciel WinCATS 1.3.3 (CAMAG), est utilisé.

##### **III. 1.3. Phases mobiles**

Afin de contrôler le contenu des extraits et d'effectuer le suivi des fractions obtenues lors des étapes de fractionnements, plusieurs systèmes d'éluants, binaires ou ternaires, sont préparés. Ils sont listés ici par polarité croissante. Lorsque les mêmes associations de solvants ont été utilisées dans des proportions de volumes différentes, celles-ci sont précisées à la suite, également par polarité croissante :

Toluène/Cyclohexane (94:6, V/V) ; (85:15, V/V)

Cyclohexane/AcOEt (92:8, V/V)

Toluène/AcOEt (98:2, V/V) ; (95:5, V/V) ; (90:10, V/V) ; (85:15, V/V) ; (80:20, V/V)

Toluène/AcOEt/MeOH (40:10:1, V/V) ; (40:10:2, V/V) ; (40:10:7, V/V)

CHCl<sub>3</sub>/ MeOH (98:2, V/V) ; (95:5, V/V) ; (92:8, V/V) ; (90:10, V/V)

Les composés isolés lors de ce travail de recherche sont observés sur CCM après élution par les systèmes de phases mobiles binaires suivants :

Toluène/AcOEt (92:8, V/V)

CHCl<sub>3</sub>/MeOH (98:2, V/V)

CHCl<sub>3</sub>/MeOH (95:5, V/V)

CHCl<sub>3</sub>/MeOH (92:8, V/V)

CHCl<sub>3</sub>/MeOH (90:10, V/V)

### III. 1.4. Détection et révélateurs chimiques

Après élution, les plaques CCM sont observées sous lumière UV à 254 nm et 366 nm avant d'être révélées à la lumière visible grâce à différents révélateurs chimiques.

Les chromatographies sont révélées en contrôle de routine par le réactif universel à la vanilline sulfurique, préparé comme suit :

#### ➤ Révélateur à la vanilline sulfurique (réactif universel)

Pour 100 mL de solution, 1 g de vanilline est introduit dans 90 mL d'éthanol à 96%. Dix mL d'acide sulfurique sont ensuite ajoutés précautionneusement à la solution, car il se produit une réaction exothermique. Le révélateur à la vanilline sulfurique est conservé à l'abri de la lumière. Il s'agit d'un révélateur dit universel, car il permet de révéler la plupart des composés organiques par des taches de couleurs variables après chauffage.

Nous avons également utilisé d'autres révélateurs spécifiques de certaines familles moléculaires, notamment pour la détection des lactones sesquiterpéniques et des alcaloïdes.

#### ➤ Réactif de Zimmermann (sesquiterpènes) (Wagner, Bladt, et Rickl 1996)

Ce révélateur est composé de deux solutions. La solution *A* est préparée en introduisant 10 g de dinitrobenzène dans 90 mL de toluène. La solution *B* contient 6 g de NaOH dissous dans 25 mL d'eau et 45 mL de méthanol. La solution *B* est pulvérisée après une première pulvérisation de la solution *A* sur la plaque. La révélation se fait après chauffage et les lactones sesquiterpéniques apparaissent alors sous formes de taches violet-gris.

#### ➤ Réactif Cérium Ammonium Molybdate (CAM ou réactif de Hanessian, réactif universel)

Deux grammes et demi d'heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>-Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>-(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>), ainsi que 1 g de sulfate de cérium sont introduits dans 90 mL d'eau auxquels sont ajoutés ensuite précautionneusement 10 mL d'acide sulfurique concentré. La solution doit être maintenue à l'abri de la lumière. Les composés révélés au réactif CAM apparaissent alors sous forme de taches bleues/noires après chauffage.

- **Réactif de Dragendorff** (alcaloïdes et composés hétérocycliques azotés) (Wagner, Blatt, et Rickl 1996)

Le réactif de Dragendorff est un révélateur qui doit être préparé extemporanément à partir de deux solutions *A* et *B* et ne peut être conservé ensuite qu'une quinzaine de jours au réfrigérateur. La solution *A* est préparée en dissolvant 0,85 g de nitrate basique de bismuth dans 10 mL d'acide acétique glacial et 40 mL d'eau en chauffant légèrement. La solution *B* contient 8 g d'iodure de potassium dissous dans 30 mL d'eau. Les deux solutions sont stockées séparément. Pour préparer le révélateur avant la pulvérisation, 1 mL de solution *A* et 1 mL de solution *B* sont mélangés à 2 mL d'acide acétique glacial et 10 mL d'eau.

Les photographies des plaques CCM détectée sous UV (254 nm et 366 nm) ainsi que sous lumière visible sont prises à l'aide du système de scanner de CCM Reprostar3 (CAMAG), équipé d'un appareil photo digital Canon Power Shot G5 piloté par le logiciel WINCATS 1.3.3 (CAMAG).

### **III. 2. Chromatographies liquides Haute et Ultra Haute Performance**

Plusieurs systèmes de chromatographies liquides analytiques ont été utilisés durant ce travail de recherche, selon les laboratoires où ont été effectuées les analyses.

#### **III. 2.1. HPLC-DAD**

L'UMR 152 possède un système HPLC HITACHI Merck composé d'une pompe quaternaire Lachrom L-7100, d'un détecteur à barrette de diode LaChrom L-7455, d'une interface D-7000, le tout piloté par le logiciel D-7000 HSM. La boucle d'injection est une boucle de 20  $\mu$ L. La séparation chromatographique est réalisée grâce à une colonne Phenomenex Luna C18(2) 3  $\mu$ m, 4,6 x 150 mm, 100 Å, éluée avec différentes phases mobiles à un débit de 1 mL/min, en mode gradient, afin d'optimiser la séparation des échantillons. L'eau utilisée est purifiée et désionisée par un système Millipore Simplicity® 185.

#### **III. 2.2. UHPLC-DAD**

##### **III. 2.2.1 Système UHPLC-DAD HITACHI (UMR 152, Toulouse)**

La séparation chromatographique des échantillons est réalisée sur une colonne Phenomenex Luna C18(2) 3  $\mu$ m, 4,6 x 150 mm, 100 Å à un débit de 1 mL/min en mode HPLC. Le système utilisé est un système UHPLC HITACHI (VWR International, Fontenay-Sous-Bois, France) équipé de deux pompes LaChrom ULTRA L-2160U, d'un passeur d'échantillons LaChrom ULTRA L-2200U, d'un four thermostaté LaChrom ULTRA L-2300 et d'un détecteur à barrette de diode LaChrom ULTRA L-2455U, le tout contrôlé par le



logiciel EZchrom *Elite*. La colonne est éluée par différents systèmes de phases mobiles, en mode gradient, afin d'optimiser la séparation des échantillons.

### **III. 2.2.2      Système    UHPLC-DAD ACCELA (LDRI, UCL, Bruxelles)**

La séparation chromatographique des échantillons est effectuée sur une colonne Hypersil Gold 1,9  $\mu\text{m}$  C8 (Thermo Fisher Scientific) éluée à un débit de 0,5 mL/min en mode UHPLC et sur une colonne Phenomenex Luna C18(2) 3  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150 mm, 100 Å à un débit de 1 mL/min en mode HPLC. Le système UHPLC Accela (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Allemagne) est équipé d'un système de pompe quaternaire, d'un dégazeur, d'un compartiment de colonne et d'un passeur d'échantillon thermostatés, couplés à un détecteur DAD. Le système est piloté par le logiciel LCQ Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). Les colonnes sont éluées par différents systèmes de phases mobiles, en mode gradient, afin d'optimiser la séparation des échantillons.

## **III. 3.      Méthodes de chromatographies préparatives**

La séparation des composés est réalisée par différentes techniques de chromatographies préparatives :

- Chromatographie sur colonnes ouvertes
- Chromatographie liquide sous moyenne pression
- Chromatographie sur silice greffée en C-18
- Chromatographie d'exclusion Sephadex LH-20
- Chromatographie liquide haute pression préparative

### **III. 3.1.      Chromatographie sur Colonnes ouvertes (CC)**

Des colonnes ouvertes en verre, rodées à l'extrémité supérieure, sont utilisées et conditionnées en phase normale par du gel de silice de granulométrie 40-63  $\mu\text{m}$  de marque Merck silica gel 60A (40-63  $\mu\text{m}$ ), activé quelques heures auparavant à 110°C dans une étuve. La quantité de silice introduite dans la colonne correspond approximativement à une charge de cinquante fois la masse de l'échantillon à séparer, ce rapport pouvant être diminué ou augmenté selon qu'une séparation grossière ou bien qu'une meilleure résolution sont souhaitées. Différentes tailles de colonnes sont également utilisées, choisies en fonction de la quantité d'échantillon chargée. Le dépôt des échantillons à la surface de la silice est réalisé par deux techniques usuelles que sont le dépôt liquide, ou bien le dépôt solide lorsque la solubilité de l'échantillon dans la phase mobile ne permet pas la première méthode. L'échantillon est alors solubilisé dans un solvant adapté puis mis en contact avec de la silice et séché à siccité. Cela permet d'adsorber l'échantillon sur la silice et de déposer ensuite celle-ci en surface de la colonne. Le tout est recouvert soit d'une épaisseur de laine de verre, soit d'une couche de sable de Fontainebleau SDS (Peypin, France). L'utilisation de colonnes rodées permet de fixer des ballons contenant la phase mobile au-dessus de la colonne et

d'augmenter le flux de solvant par principe de gravité. Cela permet également de fixer au niveau du ballon un système permettant d'injecter de l'air comprimé, exerçant ainsi une pression légère lorsque cela est nécessaire. Les colonnes sont éluées par différents systèmes de phases mobiles, en mode gradient, afin d'optimiser la séparation des échantillons.

### **III. 3.2. Chromatographie Liquide sous Moyenne Pression (MPLC)**

Des colonnes en verre borosilicaté de marque BÜCHI sont utilisées pour la chromatographie liquide sous moyenne pression. Ces colonnes sont conditionnées en phase normale par un gel de silice de granulométrie 6-35 µm de marque SDS silica gel 60A (6-35 µm) (Peypin, France) activé quelques heures auparavant à 110°C dans une étuve. La pression à l'entrée de la colonne est générée par une pompe BÜCHI 688 distribuant un débit de 30 mL/min, à une pression de 2 à 3 Bar. Les échantillons sont introduits par un dépôt solide à la surface de la silice, tel que décrit plus haut. Les colonnes sont éluées par différents systèmes de phases mobiles, en mode gradient, afin d'optimiser la séparation des échantillons.

### **III. 3.3. Chromatographie sur silice greffée en C-18**

La chromatographie en phase inverse est réalisée sur gel de silice greffée de chaînes carbonées à 18 atomes de carbone, contenu dans des cartouches d'extraction en phase solide préconditionnées de type Agilent C18 Bond Elut SPE. Ces cartouches sont éluées grâce à un système de mise sous vide constitué d'un collecteur de fractions Varian Vac Elut SPS 24 Manifold (Vac Elut®) et d'une pompe Diaphragm Pump Chem. Resistant MPC 101 Z 230V 50/60Hz (Ilmvac™). Une pompe ILMVAC LVS 101 p (Ilmvac™) est utilisée lorsqu'un plus grand vide est nécessaire. Les cartouches sont éluées par différents systèmes de phases mobiles, en mode gradient, afin d'optimiser la séparation des échantillons.

### **III. 3.4. Chromatographie d'exclusion stérique sur Sephadex LH-20**

La séparation des échantillons peut être réalisée par la technique de chromatographie d'exclusion stérique dont le mécanisme principal consiste à séparer les molécules par leur taille moléculaire, en faisant passer l'échantillon au travers d'un tamis moléculaire constitué de fines billes polymères, ici du gel de dextran hydroxypropylé Sephadex LH-20 (Sigma Aldrich), qui ont été réticulées pour créer un réseau de polysaccharide. Les composés les plus volumineux sont élués les premiers tandis que les molécules de tailles inférieures sont éluées tardivement, car piégées au sein du tamis moléculaire. Deux autres principes de séparation interviennent également dans une moindre mesure comme le phénomène d'adsorption et le phénomène de partage, notamment en fonction des solvants utilisés (il est ainsi possible de séparer deux isomères de position). La quantité de Sephadex LH-20 utilisée correspond à environ 50 fois le poids d'échantillon chargé, conformément aux recommandations du fabricant. Le gel de Sephadex LH-20 est conditionné au contact du solvant d'éluion pendant

au moins 3 h. La quantité de phase mobile utilisée nécessaire au conditionnement du gel correspond à environ trois fois la masse de gel utilisé. Les colonnes sont éluées par différents systèmes de phases mobiles, en mode isocratique et des fractions d'un très faible volume (1 mL) sont collectées afin d'optimiser la séparation des échantillons.

### **III. 3.5. HPLC semi-préparative**

La purification des fractions par Chromatographie Liquide Haute Performance est réalisée au sein de notre laboratoire grâce à un système HPLC HITACHI Merck composé d'une pompe quaternaire Lachrom L-71000, d'un détecteur à barrette de diode LaChrom L-7455, d'une interface D-7000, le tout piloté par le logiciel D-7000 HSM. La boucle d'injection utilisée en mode préparatif permet une charge de 500 µL. Les échantillons sont préparés à une concentration de 5 mg/mL, filtrés sur filtre nylon 0,45 µm puis injectés et séparés sur une colonne Phenomenex Luna C18(2) 5 µm, 10 x 150 mm, 100 Å, éluée par la phase mobile à un débit de 3 mL/min. La phase mobile est composée de deux solvants dans des proportions variables selon les analyses : l'acétonitrile qualité HPLC (Fisher Chemical) et l'eau purifiée, acidifiée à l'acide formique à hauteur de 0,1 %. La séparation des composés est réalisée en mode gradient, permettant d'augmenter le pouvoir d'élution de la phase mobile au cours de l'analyse. L'eau utilisée est purifiée et désionisée par un système Millipore Simplicity 185.

## **IV. Méthodes analytiques ou physico-chimiques**

### **IV. 1. Spectrométrie de masse**

#### **IV. 1.1. Spectrométrie de Masse Basse Résolution (MS)**

En routine, les analyses de MS sont effectuées au laboratoire de l'UMR 152, grâce à un spectromètre de masse de type trappe d'ions Thermo-Finningan® LCQ Deca XP Max équipé d'une interface d'ionisation électrospray le plus souvent, ou bien APCI, en mode positif et négatif, le tout contrôlé par le logiciel Xcalibur.

Certains spectres de masse sont également enregistrés au service commun de spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie de Toulouse (ICT, FR2599) grâce à un spectromètre de masse DSQ Thermo Fisher Scientific équipé d'une source d'ionisation chimique (DCI/NH<sub>3</sub>).

#### **IV. 1.2. Spectrométrie de Masse Haute Résolution (HRMS)**

Les analyses de spectrométrie de masse et de fragmentations séquentielles (MS<sup>n</sup>) sont réalisées grâce à un spectromètre de masse haute résolution LTQ-Orbitrap XLml (Thermo Fisher Scientific) appartenant à la plateforme d'analyses chimiques par spectrométrie de masse de métabolites et de composés d'intérêts pharmaceutique et biologique MASSMET de

l'Université Catholique de Louvain (Bruxelles). Le processus d'ionisation appliqué est l'électrospray (ESI), la détection se fait en mode positif. Le logiciel LCQ Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) permet de réaliser l'acquisition et le traitement des spectres. Les paramètres d'ionisation de la source sont optimisés à partir d'une solution à 0,5 mg/mL du composé isolé **PS-11** en infusion directe. Les paramètres de source sont les suivants : la température et la tension du capillaire sont réglées à 270°C et 12 V, respectivement ; les tensions de la source et du tube de transfert, sont réglées respectivement à 5 kV et 180 V. L'azote est utilisé comme gaz de nébulisation à un débit de 8 unités arbitraires. L'acquisition des spectres est réalisée dans une gamme de masse  $m/z$  comprise entre 150 et 1000, avec un pouvoir de résolution fixé à 30 000. Les spectres de fragmentation CID sont ensuite acquis pour chaque composé par infusion directe. Les ions obtenus (MS) sont fragmentés en direct (MS<sup>2</sup> et MS<sup>3</sup>) avec des énergies de collision variant de 15 à 25 eV selon les besoins, permettant d'établir leur schéma de fragmentation.

#### IV. 2. Couplage UHPLC-HRMS (ESI)

Les lactones sesquiterpéniques isolées à partir de *P. spiralis* ainsi que des fractions enrichies sont analysées par Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse Haute Résolution (UHPLC-MS).

La séparation chromatographique des échantillons est effectuée sur une colonne Hypersil Gold 1,9  $\mu$ m C8 (Thermo Fisher Scientific) grâce à un système UHPLC Accela (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Allemagne) équipé d'un système de pompe quaternaire, d'un dégazeur, d'un compartiment de colonne et d'un passeur d'échantillon tous deux thermostatés, couplé à un détecteur DAD. Le système est piloté par le logiciel LCQ Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). Les phases mobiles employées sont les suivantes : solvant A (H<sub>2</sub>O, 2% de CH<sub>3</sub>COOH) and B (MeCN/MeOH/CH<sub>3</sub>COOH 88:10:2). La colonne est maintenue à une température de 25°C et éluée dans les conditions initiales avec un gradient comprenant 10% de solvant B (0-5 min), puis la proportion de solvant B est augmentée de 10 à 30 % (5-15 min) ; 30-100% solvant B (15-20 min). La colonne est alors rincée avec 100 % de solvant B pendant 2 min (20-22 min) avant de revenir dans les conditions initiales de gradient : 10% B (22-24 min), maintenues durant 6 min (24-30 min). Le temps d'analyse total est donc de 30 min avec un débit de 0,5 mL/min. Cinq  $\mu$ L de solution sont injectés à chaque analyse et l'élution des composés est suivie par absorbance dans l'UV à une longueur d'onde de  $\lambda=285$  nm. Le passeur d'échantillon est maintenu à une température de 25°C pendant le temps d'analyse.

Le système UHPLC Accela est couplé au spectromètre de masse haute résolution LTQ-Orbitrap XL décrit plus haut avec une source d'ionisation électrospray. La détection se fait en mode positif. De même que pour les analyses en infusion directe, les paramètres de la source ont été optimisés à l'aide d'une solution à 0,5 mg/mL du composé isolé **PS-11**. Les paramètres sont les suivants : la température et la tension du capillaire restent inchangées par rapport à l'introduction directe, respectivement de 270°C et 12 V ; de même que la tension de la source à 5 kV et la tension du tube de transfert à 180 V. Le débit de l'azote, gaz de

nébulisation, est augmenté à 20 unités arbitraires, tandis qu'un gaz auxiliaire (azote) est utilisé à un débit de 30 unités arbitraires, principalement à cause de la condensation formée dans la source due à la forte proportion d'eau dans le solvant UHPLC. La fenêtre d'acquisition des spectres est légèrement réduite à des masses  $m/z$  comprises entre 150-1000 au vu des bas poids moléculaires des molécules. Le pouvoir de résolution reste inchangé à 30 000. Concernant les composés isolés, les ions obtenus (MS) sont fragmentés en direct en MS<sup>2</sup> avec des énergies de collision de 35 eV. La faiblesse du signal obtenu en MS<sup>2</sup> par cette méthode de couplage n'a pas permis d'étudier la fragmentation au-delà de la MS<sup>2</sup>. Concernant la déréplication de l'extrait issu de **Lot D**, un programme de fragmentation dit «data-dependent scan» a été utilisé en LC-MS/MS afin que l'ion le plus abondant de chaque scan (MS) soit sélectionné et fragmenté ensuite en MS<sup>2</sup>.

#### **IV. 3. Résonance Magnétique Nucléaire**

Les spectres de résonance magnétique nucléaire <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et 2D ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker Avance 300 (300 MHz), ou bien 500 (500 MHz), ce dernier étant équipé d'une cryosonde Prodigy permettant une meilleure sensibilité. Les spectromètres sont contrôlés par le logiciel Topspin™ (Bruker). Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés CDCl<sub>3</sub> ou MeOD puis introduits dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) servant de référence. Les constantes de couplage  $J$  sont exprimées en Hz. Le traitement des spectres a été réalisé grâce au logiciel de RMN MNova™ (Mestrelab Research).

### **V. Tests biologiques**

#### **V. 1. Tests biologiques de criblage**

Les tests de criblage des extraits et des premiers fractionnements bioguidés ont été réalisés sur deux modèles de parasites du genre *Leishmania*, *L. amazonensis* et *L. infantum*, selon une méthode basée sur une mesure spectrophotométrique. Les parasites sont mis en présence de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT) qui est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des parasites vivants. Le formazan est un produit coloré en violet foncé dont la concentration reflète l'activité mitochondriale du parasite et donc sa survie. L'intensité de la coloration du milieu est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et est mesurée par spectrophotométrie (Estevez *et al.*, 2007). Les tests effectués sur *L. amazonensis* ont été effectués à l'UPCH, à Lima (Pérou) et ceux sur *L. infantum* à l'UMR 152, à Toulouse. Les deux tests de criblages sont réalisés selon le même protocole décrit ci-dessous.

Les amastigotes axénique de *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/LBT-012) ou de *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) sont incubés pendant sept jours dans un milieu MAA/20 (Milieu de croissance Axénique pour Amastigote) à un pH de 5,8 et maintenus sous atmosphère humide à 32°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu MAA/20 est préparé à partir d'un milieu modifié 199, supplémenté avec 0,5% de Trypto Caséine de Soja, 5 mM de D-Glucose, 5 mM de L-Glutamine, 25 mM d'HEPES, 4 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 0,023 mM d'hémine et 20% de SVF. Les parasites sont ensuite ensemencés dans une plaque de 96 puits à une densité de 2.10<sup>5</sup> parasites/puits en présence des composés préalablement dissous dans du DMSO aux concentrations souhaitées. La concentration finale en DMSO est toujours inférieure à 0,1% de la concentration finale. Après une période de 72 h d'incubation à 32°C, 10 µL de MTT (Sigma) à 10 µg/mL sont introduits dans chaque puits et les plaques sont de nouveau mises à incuber pendant 4 h. La réaction est alors stoppée par ajout de 100 µL d'une solution à 50% d'isopropanol et 10% de SDS. Les plaques sont alors remises à incuber sous agitation pendant 30 min à température ambiante. La densité optique des solutions contenues dans les puits est mesurée à une longueur d'onde de 595 nm grâce à un spectrophotomètre de plaque. Le DMSO a été utilisé comme blanc et la doxorubicine (Sigma Aldrich) comme contrôle positif.

## V. 2. Évaluation de l'activité leishmanicide

L'activité leishmanicide des composés isolés a tout d'abord été évaluée *in vitro* sur les formes promastigotes de *Leishmania infantum* en déterminant les concentrations en composés inhibant de 50% la viabilité des parasites ou CI<sub>50</sub> (concentration inhibitrice 50). Les CI<sub>50</sub> obtenues ont été comparées à celles de différentes drogues leishmanicides de référence : l'amphotéricine B, la miltéfosine et la pentamidine.

Afin d'évaluer la sélectivité des composés vis-à-vis du parasite, leurs cytotoxicités respectives ont également été déterminées *in vitro* sur lignée cellulaire de macrophages murins J774A.1, et les concentrations cytotoxiques 50 (CC<sub>50</sub>) ont été déterminées et comparées à celles de la doxorubicine servant de contrôle positif. Le rapport entre la cytotoxicité d'un produit et son activité permet de déterminer son index de sélectivité (SI = CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>).

L'espèce utilisée pour la réalisation des tests d'activité lors de ce travail est *Leishmania infantum* MHOM/MA/67/ITMAP-263 (CNR Leishmania, Montpellier, France) exprimant une activité luciférase.

### V. 2.1. Activité antileishmanienne sur promastigotes

L'activité des molécules testées sur la viabilité de *Leishmania infantum* est évaluée par la quantification de l'activité de la luciférase. Le principe du test est le suivant : les promastigotes en phase de croissance logarithmique sont incubés dans un milieu RPMI 1640 enrichi par 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de L-glutamine et des antibiotiques (100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 50 µg/mL de généticine), à une

densité moyenne de  $10^6$  parasites/mL dans des plaques 96 puits stériles en présence des composés préalablement dissous dans du DMSO aux concentrations souhaitées, en duplicata. La concentration finale en DMSO est toujours inférieure à 0,5% V/V. Les contrôles appropriés sont ajoutés à chaque essai, à savoir témoin de croissance, témoin solvant (avec le DMSO seul) et témoin positif (amphotéricine B, Sigma Aldrich). Après une période de 72 h d'incubation à 24°C, chacun des puits de la plaque est examiné au microscope afin de détecter la formation éventuelle de précipités. Afin d'estimer l'activité de la luciférase exprimée par les promastigotes, 80 µl de solution prélevés dans chaque puits sont transférés dans une plaque 96 puits blanche, puis le réactif Steady Glo® (Promega) est ajouté selon les instructions données par le fabricant. Les plaques sont ensuite incubées 2 min. La luminescence est mesurée par le compteur à Microbeta® (PerkinElmer). La  $CI_{50}$  est calculée par une méthode d'analyse de données en régression non linéaire à partir des courbes dose-réponse, en utilisant le logiciel TableCurve 2D V5. Les valeurs de  $CI_{50}$  données représentent la valeur de  $CI_{50}$  moyenne calculée à partir de 3 analyses indépendantes.

### **V. 2.2.      Activité antileishmanienne sur amastigotes axéniques**

Les promastigotes de *L. infantum* en phase de croissance logarithmique sont centrifugés à 900 g durant 10 min. Le milieu de culture est alors remplacé par le milieu MAA/20 et les cellules sont incubées à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> afin d'induire la différenciation en amastigotes axéniques (Sereno et Lemesre 1997). Les amastigotes axéniques sont incubés à une concentration de  $4.10^6$  cellules/mL dans une plaque 96 puits stérile en présence de différentes concentrations d'échantillons (en triplicat) dissous dans du DMSO (concentration finale 1% V/V) et des contrôles appropriés à savoir le contrôle négatif avec le DMSO seul et un contrôle positif (amphotéricine B, Sigma Aldrich). Après 72 h d'incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, la viabilité des amastigotes axéniques est évaluée par le test à la luciférase selon le protocole décrit précédemment pour les promastigotes. Les valeurs de  $CI_{50}$  données représentent la valeur de  $CI_{50}$  moyenne calculée à partir de 2 analyses indépendantes.

### **V. 2.3.      Activité antileishmanienne sur amastigotes intracellulaires**

Les effets des molécules testées sur la viabilité des amastigotes intracellulaires de *L. infantum* ont été évalués selon le protocole suivant. Les macrophages J774A.1 à une concentration de  $1.10^5$  cellules/mL sont incubés, à raison de 200 µL/puits, en plaques 96 puits stériles pendant 24 h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. En parallèle, les promastigotes sont centrifugés à 900 g durant 10 min, le milieu de culture est remplacé par du RPMI 10% pH 5,4 puis les cellules sont incubées 24 h à 27°C. Les macrophages sont infectés par les promastigotes acidifiés avec un ratio de 10 promastigotes par macrophages, puis incubés 24 h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. La moitié du milieu des macrophages infectés est éliminée et le milieu contenant différentes concentrations en molécules testées est ensuite ajouté, en duplicata. La concentration finale de DMSO n'est jamais supérieure à 0,25 % V/V. Les contrôles appropriés sont ajoutés à chaque essai, à savoir le contrôle négatif sans DMSO, ou avec DMSO seul, ainsi que deux contrôles positifs, l'amphotéricine B (Sigma Aldrich) et la

miltéfosine (Sigma-Aldrich). Après 120 h d'incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, 100 µL du surnageant de chaque puits sont ôtés et le réactif Steady Glo® (Promega) est ajouté selon les recommandations du fabricant. Les plaques sont ensuite incubées pendant 3 min. Cent microlitres de chacun des puits sont transférés dans une plaque de 96 puits blanche et la luminescence est mesurée avec le compteur de luminescence Microbeta® (PerkinElmer). La CI<sub>50</sub> est calculée par une méthode d'analyse de données en régression non linéaire à partir des courbes dose-réponse, en utilisant le logiciel TableCurve 2D V5. Les valeurs de CI<sub>50</sub> données représentent la valeur de CI<sub>50</sub> moyenne calculée à partir de 3 analyses indépendantes.

### **V. 3. Évaluation de la cytotoxicité sur macrophages et cellules VERO**

La cytotoxicité des molécules testées sur les lignées cellulaires J774A.1 (lignée cellulaire de macrophages murins, Sigma-Aldrich) et VERO (lignée cellulaire épithéliale de rein de singe, Sigma-Aldrich) est évaluée grâce au test MTT réalisé selon Mosmann (Mosmann 1983), avec de légères modifications. Les cellules, à une concentration de  $5.10^4$  cellules/mL, en milieu RPMI 1640, à 10% de SVF, 2 mM de L-glutamine et des antibiotiques (100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine) pour les macrophages et en milieu MEM à 10% de SVF, 2 mM de L-glutamine et des antibiotiques (100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL streptomycine), AANE (Acides Aminés Non Essentiels) 1X pour les cellules VERO, sont déposées en plaque 96 puits, puis incubées à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Après 24 h d'incubation, 100 µL de milieu contenant les composés à tester à diverses concentrations en présence du témoin solvant et du témoin positif (doxorubicine, Sigma Aldrich) sont ajoutés à la plaque qui est incubée de nouveau pendant 72 h à 37°C. Chaque puit est examiné au microscope afin de détecter la présence éventuelle d'un précipité. Après avoir retiré le surnageant, 100 µL/puits de MTT à 0,5 mg/mL dans du RPMI 1640 sont alors ajoutés. Les plaques sont incubées pendant 2 h à 37°C. La solution de MTT est ensuite éliminée et remplacée par 100 µL de DMSO afin de dissoudre les cristaux de formazan résultants. Les plaques sont alors agitées vigoureusement (300 rpm) pendant 5 min. L'absorbance des solutions contenues dans les puits est mesurée à une longueur d'onde de 570 nm grâce à un spectrophotomètre (EON). La concentration cytotoxique 50 (CC<sub>50</sub>) est calculée par une méthode d'analyse de données en régression non linéaire à partir des courbes dose-réponse, en utilisant le logiciel TableCurve 2D V5. Les valeurs de CC<sub>50</sub> données représentent les valeurs de CC<sub>50</sub> moyennes calculées à partir de 3 analyses indépendantes.

### **V. 4. Évaluation de l'activité antipaludique**

L'activité antipaludique des molécules et extraits testés est évaluée sur une souche résistante à la chloroquine FcM29-Cameroun. La technique de culture continue de *P. falciparum in vitro* utilisée est dérivée de celle mise au point par Trager et Jensen en 1976 (Trager et Jensen 1976). Les parasites sont maintenus *in vitro* dans une solution de globules rouges humains à 1% d'hématocrite dans du RPMI 1640 (Life technologies, Gibco, France) contenant 25 mM d'HEPES et 2,05 mM de L-Glutamine, enrichi par 5% de sérum humain



(Banque française du sang, EFS). La culture est maintenue en atmosphère humide à 37°C contenant 5% de CO<sub>2</sub>. La parasitémie de la souche cultivée est contrôlée sur frottis minces colorés au Giemsa et quotidiennement réajustée à 2% par ajout d'érythrocytes sains.

L'activité antipaludique de chaque molécule et extrait est estimée selon une méthode dérivée de celle de Desjardins (Desjardins *et al.*, 1979). Ce test permet de mesurer l'inhibition de la croissance des parasites en culture en présence de diverses concentrations de molécule ou d'extrait. Cette évaluation repose sur la mesure de l'incorporation d'un précurseur des bases puriques marqué au tritium : l'hypoxanthine tritiée. Ce test est effectué en plaques de 96 puits. Chaque puits reçoit 100 µL d'une solution à 2% de parasitémie et à 1% d'hématocrite. Les extraits et molécules à tester sont ensuite distribués selon des dilutions croissantes (à raison de 100 µL par puits) et laissés au contact des parasites pendant 48 h en atmosphère humide à 37°C contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Vingt-quatre heures après le début de l'incubation, le milieu de chaque puits est complété avec 50 µL de milieu de culture complet et 0,25 µCi d'hypoxanthine tritiée. A la fin de l'incubation, les acides nucléiques radioactifs des parasites sont collectés sur filtres dont la radioactivité est évaluée grâce à un compteur β. Chaque dilution est testée en 3 puits distincts. Chaque expérience est effectuée 3 fois indépendamment. Les courbes d'inhibition de la croissance parasitaire en fonction de la concentration des molécules testées sont tracées afin de déterminer la CI<sub>50</sub> de chaque produit ou extrait.

## **V. 5. Evaluation de l'activation de monocytes/macrophages humains**

La stimulation par les molécules testées de l'expression de gènes cibles codant pour le facteur de transcription Nrf2, l'enzyme HO-1, le récepteur nucléaire PPARγ et le récepteur CD36 a été évaluée au sein deux populations de macrophages plus ou moins différenciées, à savoir des monocytes humains et macrophages dérivés de monocytes humains (hMDM). Les effets des composés testés sur l'expression macrophagique de ces gènes ont été déterminés par qRT-PCR quantitative en temps réel.

### **V. 5.1. Isolement des monocytes humains, différenciation en macrophages et traitement**

#### **V. 5.1.1 Obtention des monocytes humains**

Des cellules mononucléées (CM) ont été isolées à partir du sang périphérique prélevé chez des volontaires sains (Etablissement français du sang, CHU Purpan) et obtenues par centrifugation sur gradient de densité Lymphoprep (Abcys). Après séparation, les CM sont comptées en cellule de Neubauer puis distribuées dans les puits selon le plan de plaque, à raison de 500 000 CM/puits. Incubées pendant 2 h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu M-SFM contenant 200 µM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 10% de SVF, les monocytes adhèrent au plastique, ce qui permet d'éliminer les autres

cellules par aspiration. Deux lavages par PBS sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  permettent d'éliminer les autres types cellulaires.

Les monocytes obtenus sont ensuite soit activés directement par les molécules à tester, soit préalablement différenciés en macrophages avant stimulation.

#### **V. 5.1.2          Différenciation en macrophages issus de monocytes humains**

Les monocytes sont différenciés en macrophages dérivés de monocytes humains (MDMH) à l'aide du « macrophage-colony stimulating factor » (M-CSF). Pour ce faire, les monocytes sont incubés pendant 48 h à 37°C et 5% de  $\text{CO}_2$  en M-SFM complémenté en L-glutamine, pénicilline, streptomycine et SVF comme précédemment, plus 50 ng/mL de M-CSF.

### **V. 5.2.          Test des composés sur la stimulation des monocytes/macrophages**

#### **V. 5.2.1          Préparation des échantillons**

Les molécules testées sont préparées à une concentration de 10 mg/mL dans du DMSO. Leurs effets biologiques sur la stimulation des macrophages/monocytes sont évalués à des concentrations de 0,01, 0,005 et 0,0025  $\mu\text{g/mL}$  afin de d'être au dessous des concentrations toxiques de ces molécules sur les macrophages/monocytes.

#### **V. 5.2.2          Préparation des plaques**

Après un lavage en milieu de culture exempt d'antibiotique, les monocytes ou MDMH obtenus sont incubés en présence des molécules à tester. Deux témoins positifs sont constitués, à l'aide de rosiglitazone (agoniste de  $\text{PPAR}\gamma$ , utilisé à une concentration finale de 5  $\mu\text{M}$ ) et de sulforaphane (agoniste de Nrf2, utilisé à une concentration finale de 10  $\mu\text{M}$ ), ainsi qu'un témoin négatif non supplémenté en molécule. Pour l'analyse de l'expression de gènes, les plaques sont incubées 4 h à 37°C et 5% de  $\text{CO}_2$ . Pour l'étude de l'expression des protéines membranaires par cytométrie en flux, les plaques sont incubées 24 h dans les mêmes conditions.

#### **V. 5.2.3          Extraction de l'ARN et transcription inverse**

Les monocytes, ou MDHM, sont lysés à l'aide de 350  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse (kit extraction ARN, Total RNA Minipreps Super Kit, Bio Basic Inc.). L'ARN total est ensuite extrait en suivant les recommandations du fournisseur. La transcription inverse des ARN est réalisée avec le kit « Thermo Scientific Verso™ cDNA Kit » (Thermo Scientific) en suivant

le protocole fourni. La réaction est réalisée dans un volume final de 20 µL avec 11 µL d'ARN, 2 µL de dNTPs à 50 µM, 1 µL d'OligodT (500 ng/µL), 1 µL de RT enhancer (enzyme permettant d'éliminer l'ADN contaminant) et 1 µL de l'enzyme Verso. Le mélange est incubé 30 minutes à 42°C, puis 2 minutes à 95°C (Mastercycle Eppendorf).

#### V. 5.2.4 PCR quantitative

La qPCR est réalisée en plaque 384 puits avec 2 µL d'ADNc à 0,5 ng/µL et 8 µL de mix contenant 5 µL de MasterMix (Roche, Boulogne-Billancourt, France), 1 µL de chaque amorce diluée au 10<sup>ème</sup> et 1 µL d'eau. Une gamme est réalisée à partir d'un pool d'ADNc dilué au 5<sup>ème</sup>, au 10<sup>ème</sup>, au 20<sup>ème</sup> et au 50<sup>ème</sup>. Le contrôle négatif est constitué de 2 µL d'eau à la place de l'ADNc. Les gènes testés sont : Nrf2, PPAR $\gamma$ , un gène cible du facteur nucléaire Nrf2 : Hème oxygénase-1 (HO-1); CD36, gène cible du facteur de transcription PPAR $\gamma$ , ainsi qu'un gène de ménage, l'actine (amorces fournis par Eurogentec S.A., Seraing, Belgique). L'amplification est réalisée au LightCycler 480 de Roche par 60 cycles de 3 étapes : 1s à 95°C, 5s à 60°C, 20s à 72°C.

Les concentrations relatives de chaque gène sont calculées grâce à la courbe étalon réalisée avec la gamme. L'expression des différents gènes est déterminée par le rapport entre la concentration de chaque gène testé et celle du gène de ménage :  $R = \text{Conc}_{\text{gène}} / \text{Conc}_{\text{actine}}$ .

Les séquences des amorces utilisées sont données dans le **Tableau 28**.

**Tableau 28** : Séquences des amorces utilisées en PCR quantitative.

	Amorces sens (5' → 3')	Amorces anti-sens (3' → 5')
<b>Beta actine</b>	5'GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG3'	3'AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG5'
<b>CD36</b>	5'TGT AAC CCA GGA CGC TGA GG3'	3'GAA GGT TCG AAG ATG GCA CC5'
<b>Nrf2</b>	5'GCG ACG GAA AGA GTA TGA GC3'	3'GTT GGC AGA TCC ACT GGT TT5'
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	5'GCT GTG CAG GAG ATC ACA GA3'	3'GGG CTC CAT AAA GTC ACC AA5'
<b>HMOX1</b>	5'TCC GAT GGG TCC TTA CAC TC3'	3'CAA GGA AGC CAG CCA AGA GA5'

#### V. 5.2.5 Cytométrie en flux

Après 24 h d'incubation en présence des molécules à tester ou des molécules témoins, les cellules sont lavées en PBS froid puis les cellules sont décollées à l'aide de la pipette par grattage. Après comptage, 200 000 cellules sont diluées dans 1,5 mL de PBS (sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>)-1% SVF, puis centrifugées (1500 rpm, 5 min). Le culot est ensuite remis en suspension dans 100 µL d'une solution contenant un anticorps (Ac) couplé à un fluorochrome. Chaque échantillon de cellules est testé en simple marquage avec les anticorps suivants : anti-human-CD14-FITC et anti-human-CD36-APC (BD Pharmingen). L'anticorps

anti-CD14 permet de situer le nuage des monocytes, alors que l'anticorps anti-CD36 est le marqueur d'intérêt.

L'incubation avec les Ac est réalisée à l'obscurité durant 15 minutes, puis les cellules sont lavées avec 1 mL de PBS-1% SVF et centrifugées (1500 rpm, 5 min) avant d'être fixées au paraformaldéhyde 0.5% durant 1 h. Après la fixation, les cellules sont centrifugées puis remises en suspension dans 300 µL de PBS-SVF puis analysées au cytomètre en flux (BD LRSFortessa de BD Bioscience). Pour chaque mesure, 10 000 événements sont acquis dans la zone correspondant aux monocytes définie par le marquage anti-CD14, ainsi que la taille et la granulosité. Les résultats sont ensuite analysés à l'aide du logiciel BD FACSDiva.

## **- RÉFÉRENCES -**



- Abad, M-J., L.M.B. Del Olmo, L.A. Ticona, et P.B. Benito. **2012**. « Chapter 2 - The *Artemisia* L. genus: a review of bioactive sesquiterpene lactones ». *Studies in natural products chemistry*, édité par Atta-ur-Rahman, Volume 37:43-65. Studies in natural products chemistry. Elsevier.
- Abdalla, M.Y. **2011**. « Glutathione as potential target for cancer therapy; more or less is good? (mini-review) ». *Jordan Journal of Biological Sciences* 4 (3): 119-24.
- Abdel-Sattar, E., A.M. Galal, et G.S. Mossa. **1996**. « Antitumor germacranolides from *Anvillea garcinii* ». *Journal of Natural Products* 59 (4): 403-5.
- Aggarwal, B.B., et P. Gehlot. **2009**. « Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? ». *Current Opinion in Pharmacology* 9 (4): 351-69.
- Alvarenga, S.A.V., M.J.P. Ferreira, V.P. Emerenciano, et D. Cabrol-Bass. **2001**. « Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis ». *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 56 (1): 27-37.
- Amorim, M.H.R., R.M.G. Da Costa, C. Lopes, et M.M.S.M. Bastos. **2013**. « Sesquiterpene lactones: adverse health effects and toxicity mechanisms ». *Critical Reviews in Toxicology* 43 (7): 559-79.
- Amslinger, S. **2010**. « The tunable functionality of  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds enables their differential application in biological systems ». *ChemMedChem* 5 (3): 351-56.
- « Angiosperm Phylogeny ». Consulté le 24 août **2014**.  
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- « ANSM : Ibrutinib ». Consulté le 3 novembre **2014**.  
<http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/ATU-de-cohorte-en-cours/Liste-des-ATU-de-cohorte-en-cours/IBRUTINIB-140-mg-gelules>.
- Antolin, G., F.V. Tinaut, Y. Briceno, V. Castano, C. Perez, et A.I. Ramirez. **2002**. « Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification ». *Bioresource technology* 83 (2): 111-14.
- Appezzato-da-Glória, B., F.B. Da Costa, V.C. da Silva, L. Gobbo-Neto, V.L.G. Rehder, et A.H. Hayashi. **2012**. « Glandular trichomes on aerial and underground organs in *Chrysolaena species* (Vernonieae – Asteraceae): structure, ultrastructure and chemical composition ». *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 207 (12): 878-87.
- Arora, D., A. Rani, et A. Sharma. **2013**. « A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula* ». *Pharmacognosy Reviews* 7 (14): 179.

- Artz, J.D., A.K. Wernimont, L.Y. Lin, M. Amani, M. Neculai, T. Hills, et R. Hui. **2013**. « Selective inhibition of parasite protein kinases ». *Protein phosphorylation in parasites: novel targets for antiparasitic intervention*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 237-60. Christian Doerig, Gerald Spaeth, Martin Wiese.
- Ashutosh, S. Gupta, Ramesh, S. Sundar, N. Goyal. **2005**, « Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in *in vitro* drug screening », *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49 (9) : 3776-3783.
- Bardón, A., C.A.N. Catalán, A.B. Gutiérrez, et W. Herz. **1988**. « Piptocarphol esters and other constituents from *Vernonia cognata* ». *Phytochemistry* 27 (9): 2989-90.
- Bardón, A., N.I. Kamiya, C.A. De Ponce De León, C.A.N. Catalán, J.G. Díaz, et W. Herz. **1992**. « Glaucolides and related sesquiterpene lactones from *Vernonia nudiflora* and *Chrysolaena propinqua* ». *Phytochemistry* 31 (2): 609-13.
- Bardón, A., S. Montanaro, C.A.N. Catalán, J.G. Díaz, et W. Herz. **1993**. « Piptocarphols and other constituents of *Chrysolaena verbascifolia* and *Lessingianthus rubricaulis* ». *Phytochemistry* 34 (1): 253-59.
- Bélangier, G. **2014**. « Cours de Chimie organique IV COR 401 ». <http://gbelanger.espaceweb.usherbrooke.ca/COR401/COR401.pdf>.
- Berry, A., P. Balard, A. Coste, D. Olganier, C. Lagane, H. Authier, F. Benoit-Vical, *et al.* **2007**. « IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPAR $\gamma$  activation ». *European Journal of Immunology* 37 (6): 1642-52.
- Bhattacharyya, A., R. Chattopadhyay, S. Mitra, et S.E. Crowe. **2014**. « Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases ». *Physiological Reviews* 94 (2): 329-54.
- Blair, S. **2005**. *Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa Pacífica colombiana*. Universidad de Antioquia.
- Bode, J.W. **2013**. « OC IV: advanced methods and strategies in synthesis, open source lecture notes: catalytic enantioselective conjugate additions and cycloadditions 2013. (ETH-Zürich) ». <http://www.bode.ethz.ch/lecturenote>.
- Bohlmann, F., G. Brindöpke, et R. C. Rastogi. **1978**. « A new type of germacranolide from *Vernonia* species ». *Phytochemistry* 17 (3): 475-82.
- Bohlmann, F., et J. Jakupovic. **1990**. « Progress in the chemistry of the *Vernonieae* (Compositae) ». *Research Advances in the Compositae*, 3-43. Springer.
- Bohm, B.A., et T.F. Stuessy. **2001**. *Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae)*. Springer Science & Business Media.



- Borkosky, S., A. Bardón, C.A.N. Catalán, J.G. Díaz, et W. Herz. **1997**. « Glaucolides, hirsutinolides and other sesquiterpene lactones from *Vernonanthura pinguis* ». *Phytochemistry* 44 (3): 465-70.
- Borkosky, S., S.P. de León, G. Juárez, M.G. Sierra, et A. Bardón. **2009**. « Molluscicidal sesquiterpene lactones from species of the tribe *Vernonieae* (Compositae) ». *Chemistry & Biodiversity* 6 (4): 513-19.
- Borkosky, S., D.A. Valdés, A. Bardón, J.G. Díaz, et W. Herz. **1996**. « Sesquiterpene lactones and other constituents of *Eirmocephala megaphylla* and *Cyrtocymura cincta* ». *Phytochemistry* 42 (6): 1637-39.
- Bremer, K. **1994**. *Asteraceae: Cladistics and Classification*. Portland, Or: Timber Press, Incorporated.
- Breuning, A., B. Degel, F. Schulz, C. Büchold, M. Stempka, U. Machon, S. Heppner, *et al.* **2010**. « Michael acceptor based antiplasmodial and antitrypanosomal cysteine protease inhibitors with unusual amino acids ». *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (5): 1951-63.
- Brown, W., C. Foote, B. Iverson, et E. Anslyn. **2010**. *Organic Chemistry, Enhanced Edition*. Cengage Learning.
- Bruneton, J. **2009**. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Paris, France: Éd. Tec & doc.
- Buděšínský, M., N. Perez Souto, et M. Holub. **1994**. « Sesquiterpenic lactones of some species of genus *Vernonia* Schreb. » *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 59 (4): 913-28.
- Buskuhl, H., F.L. de Oliveira, L.Z. Blind, R.A. de Freitas, A. Barison, F.R. Campos, Y.E. Corilo, M. N. Eberlin, G. F. Caramori, et M. W. Biavatti. **2010**. « Sesquiterpene lactones from *Vernonia scorpioides* and their *in vitro* cytotoxicity ». *Phytochemistry* 71 (13): 1539-44.
- Bussmann, R.W., et D. Sharon. **2006**. « Traditional medicinal plant use in Loja province, southern Ecuador ». *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2 (1): 44.
- Cai, W., L. Zhang, Y. Song, B. Wang, B. Zhang, X. Cui, G. Hu, Y. Liu, J. Wu, et J. Fang. **2012**. « Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase ». *Free Radical Biology and Medicine* 52 (2): 257-65.
- Calero, J., D. Luna, E.D. Sancho, C. Luna, F.M. Bautista, A.A. Romero, A. Posadillo, et C. Verdugo. **2014**. « Development of a new biodiesel that integrates glycerol, by using CaO as heterogeneous catalyst, in the partial methanolysis of sunflower oil ». *Fuel* 122 (avril): 94-102.

- Canizales, S.A., J.S. Celemin, et J. Mora-Delgado. **2010**. « Diversidad y uso de arvenses en pasturas de fincas ganaderas del Alto Magdalena (Tolima, Colombia) ». *Zootecnia Tropical* 28 (3): 427-37.
- Carmi, C., M. Mor, P.G. Petronini, et R.R. Alfieri. **2012**. « Clinical perspectives for irreversible tyrosine kinase inhibitors in cancer ». *Biochemical Pharmacology* 84 (11): 1388-99.
- Casida, J.E., et G.B. Quistad. **1995**. *Pyrethrum flowers: production, chemistry, Toxicology, and uses*. Oxford University Press.
- Catalán, C.A.N., D.I.A. De Iglesias, J. Kavka, V.E. Sosa, et W. Herz. **1986**. « Sesquiterpene lactones and other constituents of *Vernonia mollissima* and *Vernonia squamulosa* ». *Journal of Natural Products* 49 (2): 351-53.
- Catalán, C.A.N., D.I.A. De Iglesias, J. Kavka, V.E. Sosa, et W. Herz. **1988**. « Glaucolides and related sesquiterpene lactones from *Vernonia chamaedrys* ». *Phytochemistry* 27 (1): 197-202.
- Chadwick, M., H. Trewin, F. Gawthrop, et C. Wagstaff. **2013**. « Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (6): 12780-805.
- Chea, A., S. Hout, C. Long, L. Marcourt, R. Faure, N. Azas, et R. Elias. **2006**. « Antimalarial activity of sesquiterpene lactones from *Vernonia cinerea* ». *Chemical and pharmaceutical bulletin* 54 (10): 1437-39.
- Cho, H-Y., W. Gladwell, X. Wang, B. Chorley, D. Bell, S.P. Reddy, et S.R. Kleeberger. **2010**. « Nrf2-regulated PPAR $\gamma$  expression is critical to protection against acute lung injury in mice ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182 (2): 170-82.
- Clayden, J., S. Warren, N. Greeves, et P. Wothers. **2002**. *Chimie organique*. De Boeck Supérieur.
- « Clinical Trials : bardoxolone ». *Base de données des essais cliniques humains conduits dans le monde*. Consulté le 28 janvier **2015**.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=bardoxolone>.
- « Clinical Trials : Neratinib ». *Base de données des essais cliniques humains conduits dans le monde*. Consulté le 27 novembre **2014**.  
<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=neratinib&Search=Search>.
- « Clinical Trials : RTA 402 ». *Base de données des essais cliniques humains conduits dans le monde*. Consulté le 28 janvier **2015**.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02316821?term=bardoxolone&rank=18>.
- Clonts, J. A., et S. McDaniels. **1978**. « *Elephantopus* ». *North American Flora series 2, 10*.

- Coste, A., M. Dubourdeau, M.D. Linas, S. Cassaing, J-C. Lepert, P. Balard, S. Chalmeton, *et al.* **2003**. « PPAR $\gamma$  promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13 ». *Immunity* 19 (3): 329-39.
- Cowall, P., J.M. Cassady, C-J. Chang, et J.F. Kozlowski. **1981**. « Isolation and structure determination of piptocarphins A-F, cytotoxic germacranolide lactones from *Piptocarpha chontalensis* ». *The Journal of Organic Chemistry* 46 (6): 1108-14.
- Croft, S.L., S. Sundar, et A.H. Fairlamb. **2006**. « Drug resistance in leishmaniasis ». *Clinical Microbiology Reviews* 19 (1): 111-26.
- Cronquist, A. **1970**. « New combinations in the Compositae of the Galapagos Islands ». *Madrono* 20 (5): 255-56.
- Cronquist, A. **2001**. *Vascular Flora of the Southeastern United States: Asteraceae*. UNC Press Books.
- Crotti, A. E.M, T. Fonseca, H. Hong, J. Staunton, S. E. Galembeck, N.P. Lopes, et P.J. Gates. **2004**. « The fragmentation mechanism of five-membered lactones by electrospray ionisation tandem mass spectrometry ». *International Journal of Mass Spectrometry* 232 (3): 271-76.
- Da Costa, F.B., L. Terfloth, et J. Gasteiger. **2005**. « Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics ». *Phytochemistry* 66 (3): 345-53.
- De Kraker, J-W., M.C.R. Franssen, M. Joerink, A. de Groot, et H.J. Bouwmeester. **2002**. « Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. Demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory ». *Plant Physiology* 129 (1): 257-68.
- Demirbaş, A., et H. Kara. **2006**. « New options for conversion of vegetable oils to alternative fuels ». *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* 28 (7): 619-26.
- Deramaudt, T.B., C. Dill, et M. Bonay. **2013**. « Regulation of oxidative stress by Nrf2 in the pathophysiology of infectious diseases ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 43 (3): 100-107.
- Desjardins, R.E., C.J. Canfield, J.D. Haynes, et J.D. Chulay. **1979**. « Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 16 (6): 710-18.
- Dias, H.J., N.I. de Melo, et A.E.M. Crotti. **2012**. « Electrospray ionization tandem mass spectrometry as a tool for the structural elucidation and dereplication of natural products: an overview ». *Tandem Mass Spectrometry-Applications and Principles*, édité par Jeevan Prasain, 595-618. Rijeka: InTech.

- Dinkova-Kostova, A.T., M.A. Massiah, R.E. Bozak, R.J. Hicks, et P. Talalay. **2001**. « Potency of michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (6): 3404-9.
- Dubuquoy, L. **2006**. « PPAR as a new therapeutic target in inflammatory Bowel diseases ». *Gut* 55 (9): 1341-49.
- Duraipandiyan, V., N.A. Al-Harbi, S. Ignacimuthu, et C. Muthukumar. **2012**. « Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones isolated from traditional medicinal plant, *Costus speciosus* (Koen ex.Retz.) Sm ». *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12: 13.
- Durante W. **2010**. « Targeting heme oxygenase-1 in vascular disease », *Current Drug Targets* 11 (12): 1504- 1516.
- Elahi, M.M., A. Chuang, et B.M. Matata. **2014**. « Overview of oxidative stress and cardiovascular disease ». *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*, édité par Ismail Laher, 719-64. Springer Berlin Heidelberg.
- Estevez, Y., D. Castillo, M. Tangoa Pisango, J. Arevalo, R. Rojas, J. Alban, E. Deharo, G. Bourdy, et M. Sauvain. **2007**. « Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group ». *Journal of Ethnopharmacology* 114 (2): 254-59.
- « FAOSTAT ». Consulté le 18 février **2014**.  
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- « FAO: sunflower ». Consulté le 18 février **2014**.  
[http://www.fao.org/nr/water/cropinfo\\_sunflower.html](http://www.fao.org/nr/water/cropinfo_sunflower.html).
- Farooq, M., K. Jabran, Z.A. Cheema, A. Wahid, et K. HM. Siddique. **2011**. « The role of allelopathy in agricultural pest management ». *Pest Management Science* 67 (5): 493-506.
- Favi, F., C.L. Cantrell, T. Mebrahtu, et M.E. Kraemer. **2008**. « Leaf peltate glandular trichomes of *Vernonia Galamensis* ssp. *galamensis* var. *ethiopica* Gilbert: development, ultrastructure, and chemical composition ». *International Journal of Plant Sciences* 169 (5): 605-14.
- Febbraio, M., D.P. Hajjar, et R.L. Silverstein. **2001**. « CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism ». *Journal of Clinical Investigation* 108 (6): 785-91.
- Festa, C., G. Lauro, S. De Marino, M.V. D'Auria, M.C. Monti, A. Casapullo, C. D'Amore, et al. **2012**. « Plakilactones from the marine sponge *Plakinastrella mamillaris*. Discovery of a new class of marine ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  ». *Journal of Medicinal Chemistry* 55 (19): 8303-17.

- Fischer, N.H., E.J. Olivier, et H.D. Fischer. **1979**. « The biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones ». *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 47-320. Springer.
- Fleming, I. **2011**. *Molecular orbitals and organic chemical reactions: reference edition*. John Wiley & Sons.
- Flohé, L. **2012**. « The trypanothione system and its implications in the therapy of Trypanosomatid diseases ». *International Journal of Medical Microbiology* 302 (4-5): 216-20.
- Fourquet, S. **2008**. « Régulation redox des facteurs de transcription de la famille CNC-bZip Nrf2 et Bach2. » Phdthesis, Université Paris Sud - Paris XI.
- Funk, V.A., R.J. Ba, S.K. Er, R. Chan, L. Watson, B. Gemeinholzer, E. Schilling, J.L. Panero, B.G. Baldwin, et N. Garcia-Jacas. **2005**. « Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae ». *Plant Diversity and Complexity Patterns: Local, Regional and Global Dimensions: Proceedings of an International Symposium Held at the Royal Danish Academy of Sciences and Letters in Copenhagen, Denmark, 25-28 May, 2003*, 55:343.
- Funk, V.A., A. Susanna, T.F. Stuessy, et H. Robinson. **2009**. « Classification of Compositae ». *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae*, 171-92.
- Gach, K., et A. Janecka. **2014**. «  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactones as a novel class of anti-leukemic agents ». *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents* 14 (5): 688-94.
- Galès, A. **2009**. « Rôle central des monocytes/macrophages dans la défense anti-infectieuse; implication de la polarisation M2 et des marqueurs associés Dectine-1, Récepteur Mannose et Interleukine-10 ». Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Gan, F-F., K.K. Kaminska, H. Yang, C-Y. Liew, P-C. Leow, C-L. So, L.N.L. Tu, et al. **2013**. « Identification of Michael acceptor-centric pharmacophores with substituents that yield strong thioredoxin reductase inhibitory character correlated to antiproliferative activity ». *Antioxidants & Redox Signaling* 19 (11): 1149-65.
- Gan, L-S., Y-L. Zheng, J-X. Mo, X. Liu, X-H. Li, et C-Xin. Zhou. **2009**. « Sesquiterpene lactones from the root tubers of *Lindera aggregata* ». *Journal of Natural Products* 72 (8): 1497-1501.
- García-Piñeres, A.J., V. Castro, G. Mora, T.J. Schmidt, E. Strunck, H.L. Pahl, et I. Merfort. **2001**. « Cysteine 38 in p65/NF- $\kappa$ B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (43): 39713-20.
- Gersch, M., J. Kreuzer, et S.A. Sieber. **2012**. « Electrophilic natural products and their biological targets ». *Natural Product Reports* 29 (6): 659.

- Ghantous, A., H. Gali-Muhtasib, H. Vuorela, N. A. Saliba, et N. Darwiche. **2010**. « What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? ». *Drug Discovery Today* 15 (15-16): 668-78.
- Ghoreschi, K., J. Brück, C. Kellerer, C. Deng, H. Peng, O. Rothfuss, R.Z. Hussain, *et al.* **2011**. « Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 208 (11): 2291-2303.
- Ghosh, A. K., et S. Gemma. **2014**. *Structure-based design of drugs and other bioactive molecules: tools and strategies*. John Wiley & Sons.
- « Global Compositae Checklist ». Consulté le 27 août **2014**.  
<http://dixon.iplantcollaborative.org/compositaeweb/Default.aspx>.
- « Global Compositae Checklist: “*Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist”. » Consulté le 27 août **2014**.  
<http://compositae.landcareresearch.co.nz/default.aspx?Page=NameDetails&TabNum=0&NameId=9e0cb693-d78c-40f4-ab9c-4c434b20ed60>.
- Gobbo-Neto, L., et N. P. Lopes. **2008**. « Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (4): 1193-1204.
- Götz, M.G., et K.E. James. **2008**. « Aza-peptidyl Michael acceptors. A new class of potent and selective inhibitors of asparaginyl endopeptidases (legumains) from evolutionarily diverse pathogens. » *Journal of medicinal chemistry* 51 (9): 2816-32.
- Graziose, R., M.A. Lila, et I. Raskin. **2010**. « Merging traditional chinese medicine with modern drug discovery technologies to find novel drugs and functional foods ». *Current drug discovery technologies* 7 (1): 2-12.
- Hamilton, C.J., A. Saravanamuthu, C. Poupat, A.H. Fairlamb, et I.M. Eggleston. **2006**. « Time-dependent inhibitors of trypanothione reductase: analogues of the spermidine alkaloid lunarine and related natural products ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14 (7): 2266-78.
- « HAS : Tecdifera ». *Haute Autorité de Santé*. Consulté le 25 novembre **2014**.  
[http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_1743058/fr/tecfidera-dimethyl-fumarate-traitement-de-fond-de-la-sclerose-en-plaques](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1743058/fr/tecfidera-dimethyl-fumarate-traitement-de-fond-de-la-sclerose-en-plaques).
- Herbst, D.R. **1999**. « Contributions to the flora of Hawaii. VII », Bishop Museum Occasional Papers, n° 58: 12-36.
- Herz, W., et P. Kulanthaivel. **1983**. « Piptocarphol esters from *Piptocarpha opaca* ». *Phytochemistry* 22 (5): 1286-87.

- Hong, D.S., R. Kurzrock, J.G. Supko, X. He, A. Naing, J. Wheler, D. Lawrence, *et al.* **2012**. « A phase I first-in-human trial of bardoxolone methyl in patients with advanced solid tumors and lymphomas ». *Clinical Cancer Research* 18 (12): 3396-3406.
- Hull, T.D., A. Agarwal, et J. F. George. **2014** « The mononuclear phagocyte system in homeostasis and disease: a role for heme oxygenase-1 ». *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (11): 1770-1788.
- Huo, J., S-P. Yang, B-J. Xie, S-G. Liao, L-P. Lin, J. Ding, et J-M. Yue. **2008**. « Cytotoxic sesquiterpenoids from *Vernonia bockiana* ». *Journal of Asian natural products research* 10 (5-6): 571-75.
- Hussain, H., A. Al-Harrasi, G. Abbas, N.U. Rehman, F. Mabood, I. Ahmed, M.Saleem, *et al.* **2013**. « The genus *Pluchea*: phytochemistry, traditional uses, and biological activities ». *Chemistry & Biodiversity* 10 (11): 1944-71.
- Hwang, D.R., Y.S. Wu, C.W. Chang, T.W. Lien, W.C. Chen, U.K. Tan, J.T. Hsu, H.P. Hsieh. **2006**. « Synthesis and anti-viral activity of a series of sesquiterpene lactones and analogues in the subgenomic HCV replicon system ». *Bioorg Med Chem.* 14 (1): 83-91.
- Hybertson, B.M., et B. Gao. **2014**. « Role of the Nrf2 signaling system in health and disease: role of the Nrf2 signaling system ». *Clinical Genetics* 86 (5): 447-52.
- Hybertson, B.M., B. Gao, S.K. Bose, et J.M. McCord. **2011**. « Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation ». *Molecular Aspects of Medicine, Oxidative Damage and Disease*, 32 (4-6): 234-46.
- Ikeda, Y., A. Sugawara, Y. Taniyama, A. Uruno, K. Igarashi, S. Arima, S. Ito, et K. Takeuchi. **2000**. « Suppression of rat thromboxane synthase gene transcription by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  in macrophages *via* an interaction with Nrf2 ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (42): 33142-50.
- « International Code of Botanical Nomenclature (Tokyo Code) - Appendix IIIA E. Spermatophyta [5] ». Consulté le 27 août **2014**.  
[http://www.bgbm.org/iapt/nomenclature/code/tokyo-e/APP3AE\\_5.HTM](http://www.bgbm.org/iapt/nomenclature/code/tokyo-e/APP3AE_5.HTM).
- « International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants ». Consulté le 27 août **2014**.  
<http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php?page=art60>.
- Isawumi, M.A. **1999**. « Floral microcharacters and taxonomy of the tribe Vernonieae: Asteraceae (excluding *Vernonia* Schreb.) in West Africa ». *Feddes Repertorium* 110 (5-6): 359-74.
- Issa, H.H., S.M. Chang, Y.L. Yang, F.R. Chang, et Y.C. Wu. **2006**. « New sesquiterpene lactones from the aerial parts of *Pseudoelephantopus spicatus* ». *Chemical and*

- pharmaceutical bulletin* 54 (11): 1599-1601.
- Izumi, E., L.G. Morello, T. Ueda-Nakamura, S.F. Yamada-Ogatta, B.P.D. Filho, D.A.G. Cortez, I.C.P. Ferreira, J.A. Morgado-Díaz, et C.V. Nakamura. **2008**. « *Trypanosoma cruzi*: antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms ». *Experimental Parasitology* 118 (3): 324-30.
- Jack, A.R., P.L. Norris, et F.J. Storrs. **2013**. « Allergic contact dermatitis to plant extracts in cosmetics ». *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 32:140-46.
- Jäger, T., O. Koch, et L. Flohé. **2013**. *Trypanosomatid diseases: molecular routes to drug discovery*. John Wiley & Sons.
- Jakupovic, J., G. Schmeda-hirschmann, A. Schuster, C. Zdero, F. Bohlmann, R.M. King, H. Robinson, et J. Pickardt. **1985**. « Hirsutinolides, glaucolides and sesquiterpene lactone from *Vernonia* species ». *Phytochemistry* 25 (1): 145-58
- Jeffrey, C. **1988**. « The Vernonieae in east tropical Africa: notes on Compositae: V ». *Kew bulletin*, 195-277.
- Jeney, V., S. Ramos, M-L. Bergman, I. Bechmann, J. Tischer, A. Ferreira, V. Oliveira-Marques, et al. **2014**. « Control of disease tolerance to malaria by nitric oxide and carbon monoxide ». *Cell Reports* 8 (1): 126-36.
- Johansson, M.H. **2012**. « Reversible Michael additions: covalent inhibitors and prodrugs ». *Mini reviews in medicinal chemistry* 12 (13): 1330-44.
- Juge, N., R.F. Mithen, et M. Traka. **2007**. « Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 64 (9): 1105-27.
- Kadereit, J.W., et C. Jeffrey. **2007**. *Flowering Plants. Eudicots: Asterales*. Springer.
- Klonis, N., D.J. Creek, et L. Tilley. **2013**. « Iron and heme metabolism in *Plasmodium falciparum* and the mechanism of action of artemisinins ». *Current Opinion in Microbiology*, Growth and development: eukaryotes/prokaryotes, 16 (6): 722-27.
- Kos, O., V. Castro, R. Murillo, L. Poveda, et I. Merfort. 2006. « *Ent*-kaurane glycosides and sesquiterpene lactones of the hirsutinolide type from *Vernonia triflosculosa* ». *Phytochemistry* 67 (1): 62-69.
- Kotowicz, C., A. Bardón, C.A.N. Catalán, C.M. Cerda-García-Rojas, et P. Joseph-Nathan. **1998**. « Glaucolides and hirsutinolides from *Vernonanthura squamulosa* ». *Phytochemistry* 47 (3): 425-28.
- Krishnan, S., R.M. Miller, B. Tian, R.D. Mullins, M.P. Jacobson, et J. Taunton. **2014**. « Design of reversible, cysteine-targeted Michael acceptors guided by kinetic and computational analysis ». *Journal of the American Chemical Society* 136 (36): 12624-



30.

- Kumar, H., I-S. Kim, S.V. More, B-W. Kim, et D-K. Choi. **2014**. « Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases ». *Natural Product Reports* 31 (1): 109.
- Kuo, Y-H., Y-J. Kuo, A-S. Yu, M-D. Wu, C-W. Ong, L-M. Y. Kuo, J-T. Huang, C-F. Chen, et S-Y. Li. **2003**. « Two novel sesquiterpene lactones, cytotoxic vernolide-A and -B, from *Vernonia cinerea* ». *Chemical and pharmaceutical bulletin* 51 (4): 425-26.
- Kupchan, S.M., M.A. Eakin, et A.M. Thomas. **1971**. « Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones ». *Journal of Medicinal Chemistry* 14 (12): 1147-52.
- Kupchan, S.M., D.C. Fessler, M.A. Eakin, et T.J. Giacobbe. **1970**. « Reactions of alpha methylene lactone tumor inhibitors with model biological nucleophiles ». *Science* 168 (3929): 376-78.
- Lamarti, A., A. Badoc, G. Deffieux, et J.P. Carde. **1994**. « Biogénèse des monoterpènes-II—La chaîne isoprénique ». *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 133: 79-99.
- Lavaud, P., et F. Andre. **2014**. « Strategies to overcome Trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancers: focus on new data from clinical trials ». *BMC Medicine* 12 (1): 132.
- Lee, G. M., E. Balouch, D.H. Goetz, A. Lazic, J.H. McKerrow, et C.S. Craik. **2012**. « Mapping inhibitor binding modes on an active cysteine protease *via* nuclear magnetic resonance spectroscopy ». *Biochemistry* 51 (50): 10087-98.
- Lehmann, J.M., L.B. Moore, T.A. Smith-Oliver, W.O. Wilkison, T.M. Willson, et S.A. Kliewer. **1995**. « An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ». *Journal of Biological Chemistry* 270 (22): 12953-56.
- Le Lamer, A-C., H. Authier, I. Rouaud, A. Coste, J. Boustie, B. Pipy, et N.Gouault. **2014**. « Protolichesterinic acid derivatives:  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactones as potent dual activators of PPAR $\gamma$  and Nrf2 transcriptional factors ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24 (16): 3819-22.
- Lesburg, C.A., J.M. Caruthers, C.M. Paschall, et D.W. Christianson. **1998**. « Managing and manipulating carbocations in biology: terpenoid cyclase structure and mechanism ». *Current Opinion in Structural Biology* 8 (6): 695-703.
- Liang, G., G. Chen, X. Wei, Y. Zhao, et X. Li. **2013**. « Small molecule inhibition of fibroblast growth factor receptors in cancer ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 24 (5): 467-75.
- Liao, S-G., Z. Wang, J. Li, Y. Liu, Y-T. Li, L-J. Zhang, Q-D. Long, et Y-L. Wang. **2012**. « Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Vernonia bockiana* ». *Chinese Journal of*

- Natural Medicines* 10 (3): 230-33.
- Lin, H-R. **2012**. « Sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* act as peroxisome proliferator-activated receptor agonists ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 (8): 2954-58.
- Lipinski, C. A. **2000**. « Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability ». *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, Current Directions in Drug Discovery: A Review of Modern Techniques, 44 (1): 235-49.
- Li, T-C., H-H. Mündel, et International Plant Genetic Resources Institute. **1996**. *Safflower, Carthamus Tinctorius* L. Rome, Italy: IPGRI.
- LoPachin, R. M., T. Gavin, A. DeCaprio, et D.S. Barber. **2012**. « Application of the hard and soft, acids and bases (HSAB) theory to toxicant-targeter interactions ». *Chemical Research in Toxicology* 25 (2): 239-51.
- Lopes, A.A., E.S. Pina, D.B. Silva, A.M.S. Pereira, M.F.G.F. Da Silva, F.B. Da Costa, N.P. Lopes, et M.T. Pupo. **2013**. « A biosynthetic pathway of sesquiterpene lactones in *Smallanthus Sonchifolius* and their localization in leaf tissues by MALDI imaging ». *Chemical Communications* 49 (85): 9989.
- Lu, J., et A. Holmgren. **2014**. « The thioredoxin antioxidant system ». *Free Radical Biology and Medicine*, Antioxidants, 66 (janvier): 75-87.
- Luo, Y., A.L. Eggler, D. Liu, G. Liu, A.D. Mesecar, et R.B. van Breemen. **2007**. « Sites of alkylation of human Keap1 by natural chemoprevention agents ». *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 18 (12): 2226-32.
- Lyoumi, S., F. Tamion, A. Leplingard, C. Beaumont, H. Puy, et J-P. Lebreton. **2007**. « Rôles protecteurs de l'hème oxygénase et des catabolites de l'hème ». *Hématologie* 13 (4): 251-64.
- Lyss, G. **1998**. « The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappa B by directly targeting p65 ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (50): 33508-16.
- Mabberley, D.J. **2008**. *Mabberley's plant-book: a portable dictionary of plants, their classifications, and uses*. Cambridge University Press.
- Macbride, J.F.. **1936**. *Flora of Peru*. Chicago, U.S.A. : Field Museum of Natural History.
- Maes, M., Z. Fišar, M. Medina, G. Scapagnini, G. Nowak, et M. Berk. **2012**. « New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates—Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors ». *Inflammopharmacology* 20 (3): 127-50.

- Ma, F., et M.A. Hanna. **1999**. « Biodiesel production: a review ». *Bioresource technology* 70 (1): 1-15.
- Mah, R., J.R. Thomas, et C.M. Shafer. **2014**. « Drug discovery considerations in the development of covalent inhibitors ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24 (1): 33-39.
- Marston, A., G. Dudan, M.P. Gupta, P.N. Solis, M.D. Correa, et K. Hostettmann. **1996**. « Screening of Panamanian plants for molluscicidal activity ». *Pharmaceutical Biology* 34 (1): 15-18.
- Martínez-Vázquez, M., S. Sepúlveda, M.A. Belmont, M. Rubio, et P. Joseph-Nathan. **1992**. « The transformation of glaucolide A into cadinanolides and hirsutinolides ». *Journal of natural products* 55 (7): 884-98.
- Martucci, M.E.P., R.C.H. De Vos, C.A. Carollo, et L. Gobbo-Neto. **2014**. « Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: application in the genus *Vernonia* Schreb ». Édité par Jamshidkhan Chamani. *PLoS ONE* 9 (4): e93149.
- Mathema, V.B., Y-S. Koh, B.C. Thakuri, et M. Sillanpää. **2011**. « Parthenolide, a sesquiterpene lactone, expresses multiple anti-cancer and anti-inflammatory activities ». *Inflammation* 35 (2): 560-65.
- Matuszak, N., G.G. Muccioli, G. Labar, et D.M. Lambert. **2009**. « Synthesis and *in vitro* evaluation of N-substituted maleimide derivatives as selective monoglyceride lipase inhibitors ». *Journal of Medicinal Chemistry* 52 (23): 7410-20.
- Merfort, I. **2002**. « Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones ». *Journal of Chromatography A* 967 (1): 115-30.
- Merfort, I. **2011**. « Perspectives on sesquiterpene lactones in inflammation and cancer ». *Current Drug Targets* 12 (11): 1560-73.
- Merlin, J-L. **2008**. « Les inhibiteurs de tyrosine kinase en oncologie ». *La Lettre du pharmacologue* 22 (2): 51-62.
- Merritt, C., L.E. Silva, A.L. Tanner, K. Stuart, M.P. Pollastri. **2014**. "Kinases as druggable targets in Trypanosomatid protozoan parasites". *Chemical Reviews* (114): 11280-11304.
- Miller, R.M., et J. Taunton. **2014**. « Targeting protein kinases with selective and semi-promiscuous covalent inhibitors ». *Methods in enzymology* 548: 93-116.
- Mirande, M. **1900**. « Recherches physiologiques et anatomiques sur les Cuscutacées ». Paris, France: Faculté des Sciences de Paris. Wageningen UR Library.
- Mohamed, A.J., L. Yu, C-M. Bäckesjö, L. Vargas, R. Faryal, A. Aints, B. Christensson, et al. **2009**. « Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with

- special emphasis on the PH domain ». *Immunological Reviews* 228 (1): 58-73.
- Mora, C., D.P. Tittensor, S. Adl, A.G.B. Simpson, et B. Worm. **2011**. « How many species are there on earth and in the ocean? ». *PLoS Biol* 9 (8): e1001127.
- Morais-Teixeira, E., Q.S. Damasceno, M.K. Galuppo, A.J. Romanha, et A. Rabello. **2011**. « The *in vitro* leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil ». *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106 (4): 475-78.
- Morrison, D.K. **2012**. « MAP kinase pathways ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (11): a011254.
- Mosmann, T. **1983**. « Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays ». *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2): 55-63.
- Motohashi, H., et M. Yamamoto. **2004**. « Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism ». *Trends in Molecular Medicine* 10 (11): 549-57.
- Mulliner, D., D. Wondrousch, et G. Schüürmann. **2011**. « Predicting Michael-acceptor reactivity and toxicity through quantum chemical transition-state calculations ». *Organic & Biomolecular Chemistry* 9 (24): 8400.
- Murphy, G.J., et J.C. Holder. **2000**. « PPAR- $\gamma$  agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer ». *Trends in Pharmacological Sciences* 21 (12): 469-74.
- Narita, Y., K. Okamoto, M.I Kawada, K.Takase, Y. Minoshima, K. Kodama, M. Iwata, N. Miyamoto, K. Sawada. **2014**. « Novel ATP-competitive MEK inhibitor E6201 is effective against vemurafenib-resistant melanoma harboring the MEK1-C121S mutation in a preclinical model ». *Molecular Cancer Therapeutics* (13) : 823-832.
- Narwal, S.S., et R. Haouala. **2013**. « Role of allelopathy in weed management for sustainable agriculture ». *Allelopathy*, édité par Z. A. Cheema, M. Farooq, et A.Wahid, 217-49. Springer Berlin Heidelberg.
- Nash, D.L., et L.O. Williams. **1976**. *Flora of Guatemala*. Chicago, Etats-Unis: Field Museum of Natural History.
- Nguyen, T., R.A. Coover, J. Verghese, R.G. Moran, et K.C. Ellis. **2014**. « Phenylalanine-based inactivator of AKT kinase: design, synthesis, and biological evaluation ». *ACS Medicinal Chemistry Letters* 5 (5): 462-67.
- Nicolson, D.H. **1981**. « Proposal (652) to conserve the spelling *Pseudelephantopus* over *Pseudo-Elephantopus* with a commentary on "Plant genera described by First Lieutenant von Rohr with added remarks by Professor Vahl" (1792) ». *Taxon*, 489-94.

- Nishino, M., J.W. Choy, N.N. Gushwa, J.A. Oses-Prieto, K. Koupparis, A.L. Burlingame, A.R. Renslo, J.H. McKerrow, et J. Taunton. **2013**. « Hypothemicin, a fungal natural product, identifies therapeutic targets in *Trypanosoma brucei* ». *eLife* 2 (juillet).
- Ochoa, J.G., et G.I. Andrade. **2003**. « The introduced flora to Machu Picchu sanctuary: an inventory and management priorities for biodiversity conservation ». *Ecología en Bolivia* 38: 141.
- Odonne, G., G. Herbette, V. Eparvier, G. Bourdy, R. Rojas, M. Sauvain, et D. Stien. **2011**. « Antileishmanial sesquiterpene lactones from *Pseudelephantopus spicatus*, a traditional remedy from the Chayahuita Amerindians (Peru). Part III ». *Journal of Ethnopharmacology* 137 (1): 875-79.
- Odonne, G., C. Valadeau, J. Alban-Castillo, D. Stien, M. Sauvain, et G. Bourdy. **2013**. « Medical ethnobotany of the Chayahuita of the Parapapura basin (peruvian amazon) ». *Journal of Ethnopharmacology* 146 (1): 127-53.
- Olagnier, D., R-A. Lavergne, E. Meunier, L. Lefevre, C. Dardenne, A. Aubouy, F. Benoit-Vical, et al. **2011**. « Nrf2, a PPAR $\gamma$  alternative pathway to promote CD36 expression on inflammatory macrophages: implication for malaria ». *PLoS Pathogens* 7 (9).
- Osburn, W., et T Kensler. **2008**. « Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults ». *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 659 (1-2): 31-39.
- Osorio, E., G.J. Arango, N. Jiménez, F. Alzate, G. Ruiz, D. Gutiérrez, M.A. Paco, A. Giménez, et S. Robledo. **2007**. « Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of colombian Annonaceae ». *Journal of Ethnopharmacology* 111 (3): 630-35.
- Paiva, C. N., D. F. Feijó, F. F. Dutra, V. C. Carneiro, G.B. Freitas, L.S. Alves, J. Mesquita, et al. **2012**. « Oxidative stress fuels *Trypanosoma Cruzi* infection in mice ». *Journal of Clinical Investigation* 122 (7): 2531-42.
- Pamplona, A., A. Ferreira, J. Balla, V. Jeney, G. Balla, S. Epiphany, A. Chora, et al. **2007**. « Heme Oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria ». *Nature Medicine* 13 (6): 703-10.
- Patterson, S., M.S. Alphey, D.C. Jones, E.J. Shanks, I.P. Street, J.A. Frearson, P.G. Wyatt, I.H. Gilbert, et A.H. Fairlamb. **2011**. « Dihydroquinazolines as a novel class of *Trypanosoma brucei* trypanothione reductase inhibitors: discovery, synthesis, and characterization of their binding mode by protein crystallography ». *Journal of Medicinal Chemistry* 54 (19): 6514-30.
- Paulsen, E., L.P. Chistensen, et K.E. Andersen. **2008**. « Cosmetics and herbal remedies with Compositae plant extracts : are they tolerated by Compositae-allergic patients? ». *Contact Dermatitis* 58 (1): 15-23.

- Pazourek, J.. **2010**. « Monitoring of Mutarotation of Monosaccharides by Hydrophilic Interaction Chromatography ». *Journal of Separation Science* 33 (6-7): 974-81.
- Perwez H.S., et C.C. Harris. **2007**. « Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials ». *International Journal of Cancer* 121 (11): 2373-80.
- « Pharmacopée française -Liste A des Plantes médicinales ». Consulté le 26 mars **2014**. <http://ansm.sante.fr/Mediatheque/Publications/Pharmacopee-francaise-Substances-d-origine-vegetale>.
- « Pharmacopée française - Liste B des Plantes médicinales ». Consulté le 26 mars **2014**. <http://ansm.sante.fr/Mediatheque/Publications/Pharmacopee-francaise-Substances-d-origine-vegetale>.
- Picman, A.K. **1986**. « Biological activities of sesquiterpene lactones ». *Biochemical Systematics and Ecology* 14 (3): 255-81.
- Pillay, P., R. Vlegaar, V.J. Maharaj, P.J. Smith, C.A. Lategan, F. Chouteau, et K. Chibale. **2007**. « Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staehelinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore ». *Phytochemistry* 68 (8): 1200-1205.
- Piroux, A. **2002**. « Evolution des classifications botaniques: utilitaires, morphologiques, phylogéniques. » Lyon.
- PNUE-WCMC (Comps.) **2014**. Liste des espèces CITES. Secrétariat CITES, Genève, Suisse et PNUEWCMC, Cambridge, Royaume-Uni. Téléchargé le 24 juillet 2015 <http://checklist.cites.org>
- Pollora, G.C., A. Bardón, C.A.N. Catalán, T.E. Gedris, et W. Herz. **2000**. « Sesquiterpene lactones from *Chrysolaena platensis* ». *Biochemical Systematics and Ecology* 28 (7): 707-11.
- Porter, D.M-Na. **1971**. *Flora of the Galápagos Islands*. Stanford University Press.
- Potashman, M.H., et M.E. Duggan. **2009**. « Covalent modifiers: an orthogonal approach to drug design ». *Journal of Medicinal Chemistry* 52 (5): 1231-46.
- Price, K.R., M.S. Dupont, R. Shepherd, H.W-S. Chan, et G.R. Fenwick. **1990**. « Relationship between the chemical and sensory properties of exotic salad crops—coloured lettuce (*Lactuca Sativa*) and chicory (*Cichorium Intybus*) ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 53 (2): 185-92.
- Pruski, J.F. **2011**. « Asteraceae ». *Flora Mesoamericana*, 5(2):608-25. Missouri Botanical Garden Press.
- Rabasso, N. **2006**. *Chimie organique: 1. Généralités, études des grandes fonctions et méthodes spectroscopiques*. De Boeck Supérieur.

- Radi, E., P. Formichi, C. Battisti, et A. Federico. **2014**. « Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases ». *Journal of Alzheimer's Disease* 42 (0): S125-52.
- Ragasa, C.Y., W.G. Padolina, T. Yamauchi, H. Otsuka, K. Yamasaki, et T. Satoh. **1993**. « Germacranolides from *Pseudoelephantopus spicatus* ». *Phytochemistry, The International Journal of Plant Biochemistry*, 33 (3): 627-29.
- Ragasa, C.Y., et J.A. Rideout. **2001**. « An antifungal cadinanolide from *Pseudoelephantopus spicatus* ». *Chemical & pharmaceutical bulletin* 49 (10): 1359-61.
- Rahalison, L., M. Hamburger, K. Hostettmann, M. Monod, E. Frenk, M.P. Gupta, A.I. Santana, M.D. Correa, et A.G. Gonzalez. **1993**. « Screening for antifungal activity of Panamanian plants ». *Pharmaceutical Biology* 31 (1): 68-76.
- Ramirez, A.M., N. Saillard, T. Yang, M.C.R. Franssen, H.J. Bouwmeester, et M.A. Jongsma. **2013**. « Biosynthesis of sesquiterpene lactones in *Pyrethrum* (*Tanacetum cinerariifolium*) ». *PLoS ONE* 8 (5).
- « Rapport interne : Base de Datos de Las Plantas Medicinales. 2010. IIAP ». Consulté le 24 avril **2014**.  
<http://www.scribd.com/doc/219478120/Base-de-Datos-de-Las-Plantas-Medicinales-2010-IIAP>.
- Reuter, S., S.C. Gupta, M.M. Chaturvedi, et B.B. Aggarwal. **2010**. « Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? ». *Free Radical Biology and Medicine* 49 (11): 1603-16.
- Reveal, J.L. **2012**. « An outline of a classification scheme for extant flowering plants ». *Phytoneuron* 37: 1-221.
- Rice, E.L. **1984**. *Allelopathy*. Academic Press.
- Ricote, M., J. Huang, L. Fajas, A. Li, J. Welch, J. Najib, J.L. Witztum, J. Auwerx, W. Palinski, et C.K. Glass. **1998**. « Expression of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (13): 7614-19.
- Roberts, J.S., et I. Bryson. **1984**. « Sesquiterpenoids ». *Natural Product Reports* 1 (2): 105.
- Robinson, H.E., et Smithsonian Institution. Press. **1999**. *Generic and subtribal classification of American Vernoniae*. Smithsonian contributions to botany 89. Washington, D.C., Etats-Unis: Smithsonian Institution Press.
- Robles, M., M. Aregullin, J. West, et E. Rodriguez. **1995**. « Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones ». *Planta Medica* 61 (03): 199-203.

- Rogers, D., G.P. Moss, et S. Neidle. **1972**. « Proposed conventions for describing germacranolide sesquiterpenes ». *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n° 3: 142.
- Rojas, P., C. Merare, et A.I.G. Bustamante. **2012**. « Actividad antimicrobiana *in vitro* de *Pseudelephantopus spiralis* (Lessing) Cronquis y *Alternanthera halimifolia* (Lamarck) Standley ex Pittier-IMET 2011 ». Quimico Farmaceutico, Peru: Facultad de farmacia y bioquimica.
- Rosen, E.D., et B.M. Spiegelman. **2001**. « PPAR $\gamma$ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (41): 37731-34.
- Rüngeler, P., V. Castro, G. Mora, N. Gören, W. Vichnewski, H.L. Pahl, I. Merfort, et T.J. Schmidt. **1999**. « Inhibition of transcription factor NF- $\kappa$ B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7 (11): 2343-52.
- Ryter, S.W. et A.M.K. Choi. **2015** « Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation », *Translational Research*, sous presse.
- Sajid, M., et J.H. McKerrow. **2002**. « Cysteine proteases of parasitic organisms ». *Molecular and biochemical parasitology* 120 (1): 1-21.
- Sakamoto, H.T., L.Gobbo-Neto, A.J. Cavaleiro, N.P. Lopes, et J.L.C. Lopes. **2005**. « Quantitative HPLC analysis of sesquiterpene lactones and determination of chemotypes in *Eremanthus seidelii* MacLeish & Schumacher (Asteraceae) ». *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16 (6B): 1396-1401.
- Santos, M., et R. Moreira. **2007**. « Michael acceptors as cysteine protease inhibitors ». *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 7 (10): 1040-50.
- Sartori, L.R., R. Vessecchi, H-U. Humpf, F.B. Da Costa, et N.P. Lopes. **2014**. « A systematic investigation of the fragmentation pattern of two furanoheliangolide C-8 stereoisomers using Electrospray Ionization Mass Spectrometry: fragmentation patterns of sesquiterpene lactone epimers by ESI-MS/MS ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 28 (7): 723-30.
- Schirmer, A., J. Kennedy, S. Murli, R. Reid, et D.V. Santi. **2006**. « Targeted covalent inactivation of protein kinases by resorcylic acid lactone polyketides ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (11): 4234-39.
- Schmidt, T.J. **1999**. « Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects ». *Current Organic Chemistry* 3 (6): 577-608.



- Schmidt, T.J. **2006**. « Structure-activity relationships of sesquiterpene lactones ». *Studies in Natural Products Chemistry*, édité par Atta-ur Rahman, Volume 33, Part M:309-92. Bioactive Natural Products (Part M). Elsevier.
- Schmidt, T.J., M. Ak, et U. Mrowietz. **2007**. « Reactivity of dimethyl fumarate and methylhydrogen fumarate towards glutathione and N-acetyl-L-cysteine—Preparation of S-substituted thiosuccinic acid esters ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (1): 333-42.
- Schmidt, T.J., et J. Heilmann. **2002**. « Quantitative structure-cytotoxicity relationships of sesquiterpene lactones derived from partial charge (Q)-based fractional Accessible Surface Area Descriptors (Q\_frASAs) ». *Quantitative Structure-Activity Relationships* 21 (3): 276-87.
- Schmidt, T.J., S.A. Khalid, A.J. Romanha, T.M.A. Alves, M.W. Biavatti, R. Brun, F.B. Da Costa, S.L. De Castro, *et al.* **2012**. « The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases-Part II ». *Curr. Med. Chem* 19: 2176-2228.
- Schmidt, T.J., A.M.M. Nour, S.A. Khalid, M. Kaiser, et R. Brun. **2009**. « Quantitative structure-antiprotozoal activityrelationships of sesquiterpene lactones ». *Molecules* 14 (6): 2062-76.
- Schwartz, P.A., P. Kuzmic, J.S. Solowiej, S. Bergqvist, B. Bolanos, C. Almaden, A. Nagata, *et al.* **2014**. « Covalent EGFR inhibitor analysis reveals importance of reversible interactions to potency and mechanisms of drug resistance ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (1): 173-78.
- Schwöbel, J.A.H., D. Wondrousch, Y.K. Koleva, J.C. Madden, M.T.D. Cronin, et G. Schüürmann. **2010**. « Prediction of Michael-type acceptor reactivity toward glutathione ». *Chemical Research in Toxicology* 23 (10): 1576-85.
- Scotti, M.T., V. Emerenciano, M.J.P. Ferreira, L. Scotti, R. Stefani, M.S. da Silva, et F.J.B. Mendonça. **2012**. « Self-organizing maps of molecular descriptors for sesquiterpene lactones and their application to the chemotaxonomy of the Asteraceae family ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 17 (4): 4684-4702.
- Scudder, P.H. **2013**. *Electron flow in organic chemistry: a decision-based guide to organic mechanisms*. John Wiley & Sons.
- Seaman, F.C. **1982**. « Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae ». *The Botanical Review* 48 (2): 121-594.
- Seixas, E., R. Gozzelino, A. Chora, A. Ferreira, G. Silva, R. Larsen, S. Rebelo, *et al.* **2009**. « Heme Oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (37): 15837-42.

- Sensöz, S., et D. Angin. **2008**. « Pyrolysis of safflower (*Charthamus Tinctorius* L.) seed press cake in a fixed-bed reactor: part 2. structural characterization of pyrolysis bio-oils ». *Bioresource Technology* 99 (13): 5498-5504.
- Sereno, D., et J.L. Lemesre. **1997**. « Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (5): 972-76.
- Serghides, L., et K.C. Kain. **2001**. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ -Retinoid X receptor agonists increase CD36-dependent phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes and decrease malaria-induced TNF- $\alpha$  secretion by monocytes/macrophages ». *The Journal of Immunology* 166 (11): 6742-48.
- Serghides, L., C.R. McDonald, Z. Lu, M. Friedel, C. Cui, K.T. Ho, H.T.J. Mount, J.G. Sled, et K.C. Kain. **2014**. « PPAR $\gamma$  agonists improve survival and neurocognitive outcomes in experimental cerebral malaria and induce neuroprotective pathways in human malaria ». *PLoS Pathog* 10 (3): e1003980.
- Service européen de la qualité du médicament, éd. **2014**. *Pharmacopée européenne 8.0*. 3 vol. Strasbourg, France: Council of Europe.
- Shen, Y., R. Boivin, N. Yoneda, H. Du, S. Schiller, T. Matsushima, M. Goto, H. Shirota, F. Gusovsky, C. Lemelin, Y. Jiang, Z. Zhang, R. Pelletier *et al.* **2010**. « Discovery of anti-inflammatory clinical candidate E6201, inspired from resorcylic lactone LL-Z1640-2, III ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (20) : 3155-3157.
- Sheremata, W., A.D. Brown, et K.W. Rammohan. **2014**. « Dimethyl fumarate for treating relapsing multiple sclerosis ». *Expert Opinion on Drug Safety*, novembre, 1-10.
- Shin, J-W., K. Ohnishi, A. Murakami, J-S. Lee, J.K. Kundu, H-K. Na, H. Ohigashi, et Y-J. Surh. **2011**. « Zerumbone induces Heme Oxygenase-1 expression in mouse skin and cultured murine epidermal cells through activation of Nrf2 ». *Cancer Prevention Research* 4 (6): 860-70.
- Shi, P., Y. Zhang, H. Qu, et X. Fan. **2011**. « Systematic characterisation of secondary metabolites from *Ixeris sonchifolia* by the combined use of HPLC-TOFMS and HPLC-ITMS ». *Phytochemical Analysis* 22 (1): 66-73.
- Sierra-Filardi, E., M.A. Vega, P. Sánchez-Mateos, A.L. Corbí, et A. Puig-Kröger. **2010**. « Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release ». *Immunobiology*, EMDS Special Issue: Phenotypical Diversity of Macrophages and Dendritic Cells in Tissues and Organs, 215 (9-10): 788-95.
- Singh, G. **2004**. *Plant Systematics: An Integrated Approach*. Science Publishers.

- Spichiger, R-E. **2002**. *Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales*. PPUR presses polytechniques.
- Sussan, T.E., et S. Biswal. **2014**. « Oxidative stress and respiratory diseases: the critical role of Nrf2 ». *Studies on Respiratory Disorders*, édité par N. K. Ganguly, S. K. Jindal, S. Biswal, P. J. Barnes, et R. Pawankar, 335-48. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. Springer New York.
- Tak, P.P., et G.S. Firestein. **2001**. « NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases ». *Journal of Clinical Investigation* 107 (1): 7-11.
- Takaya, K., T. Suzuki, H. Motohashi, K. Onodera, S. Satomi, T.W. Kensler, et M. Yamamoto. **2012**. « Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1-Nrf2 System ». *Free Radical Biology & Medicine* 53 (4): 817-27.
- Takayanagi, T., T. Ishikawa, et J. Kitajima. **2003**. « Sesquiterpene lactone glucosides and alkyl glycosides from the fruit of cumin ». *Phytochemistry, Reports on Structure Elucidation*, 63 (4): 479-84.
- Tan, J., S. George, Y. Kusov, M. Perbandt, S. Anemuller, J.R. Mesters, H. Norder, *et al.* **2013**. « 3C protease of enterovirus 68: structure-based design of Michael acceptor inhibitors and their broad-spectrum antiviral effects against Picornaviruses ». *Journal of Virology* 87 (8): 4339-51.
- Tenhunen, R., H.S. Marver, et R. Schmid. **1968**. « The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 61 (2): 748-55.
- Thanan, R., S. Oikawa, Y. Hiraku, S. Ohnishi, N. Ma, S. Pinlaor, P. Yongvanit, S. Kawanishi, et M. Murata. **2014**. « Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer ». *International Journal of Molecular Sciences* 16 (1): 193-217.
- The Angiosperm Phylogeny Group. **1998**. « An ordinal classification for the families of flowering Plants ». *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85 (4): 531-53.
- The Angiosperm Phylogeny Group. **2009**. « An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III ». *Botanical Journal of the Linnean Society* 161 (2): 105-21.
- Tiuman, T.S., T. Ueda-Nakamura, A. Alonso, et C.V. Nakamura. **2014**. « Cell death in amastigote forms of *Leishmania amazonensis* induced by Parthenolide ». *BMC Microbiology* 14 (1): 152.

- Tiuman, T.S., T. Ueda-Nakamura, D.A.G. Cortez, B.P.D. Filho, J.A. Morgado-Díaz, W. de Souza, et C.V. Nakamura. **2005**. « Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum Parthenium* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (1): 176-82.
- Toyang, N.J., et R. Verpoorte. **2013**. « A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae) ». *Journal of Ethnopharmacology* 146 (3): 681-723.
- Trager, W., et J.B. Jensen. **1976**. « Human malaria parasites in continuous culture ». *Science (New York, N.Y.)* 193 (4254): 673-75.
- « Tropicos | Name - *Pseudelephantopus* (Less.) Cronquist ». Consulté le 16 mars **2015**.  
<http://www.tropicos.org/Name/40037240?tab=maps&usenonflash=1>.
- « Tropicos : MGB Specimen Country Occurrence Map *Pseudelephantopus spiralis* ». Consulté le 16 mars **2015**.  
<http://www.tropicos.org/MapsCountry.aspx?maptype=3&lookupid=2711461&usenonflash=1>.
- Umemura, K., T. Itoh, N. Hamada, Y. Fujita, Y. Akao, Y. Nozawa, N. Matsuura, M. Iinuma, et M. Ito. **2008**. « Preconditioning by sesquiterpene lactone enhances H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Nrf2/ARE activation ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368 (4): 948-54.
- Uruno, A., Y. Furusawa, Y. Yagishita, T. Fukutomi, H. Muramatsu, T. Negishi, A. Sugawara, T.W. Kensler, et M. Yamamoto. **2013**. « The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus ». *Molecular and Cellular Biology* 33 (15): 2996-3010.
- « USDA : Table 13: Sunflowerseed and Products World Supply and Distribution ». Consulté le 18 février **2014**.  
<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Table+18%3a+World%3a+Sunflower+and+Products+Supply+and+Distribution+&hidReportRetrievalID=717&hidReportRetrievalTemplateID=13>.
- « USDA : Table 18: World: Sunflower and Products Supply and Distribution ». Consulté le 18 février **2014**.  
<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Table+18%3a+World%3a+Sunflower+and+Products+Supply+and+Distribution+&hidReportRetrievalID=717&hidReportRetrievalTemplateID=13>.
- Valdés, D.A., A. Bardón, C.A.N Catalán, T.E. Gedris, et W. Herz. **1998**. « Glaucolides, piptocarphins and cadinanolides from *Lepidaploa remotiflora* ». *Biochemical Systematics and Ecology* 26 (6): 685-89.
- Van Klink, J., H. Becker, S. Andersson, et W. Boland. **2003**. « Biosynthesis of anthecotuloide, an irregular sesquiterpene lactone from *Anthemis cotula* L. (Asteraceae) via a non-farnesyl diphosphate route ». *Organic & biomolecular chemistry* 1 (9): 1503-8.

- Wagner, H., S. Bladt, et V. Rickl. **1996**. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlin, pays multiples.
- Wang, G.-W., J.-J. Qin, X.-R. Cheng, Y.-H. Shen, L. Shan, H.-Z. Jin, et W.-D. Zhang. **2014**. « *Inula* sesquiterpenoids: structural diversity, cytotoxicity and anti-tumor activity ». *Expert Opinion on Investigational Drugs* 23 (3): 317-45.
- Wang, Y.-Y., Y.-X. Yang, H. Zhe, Z.-X. He, et S.-F. Zhou. **2014**. « Bardoxolone methyl (CDDO-Me) as a therapeutic agent: an update on its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties ». *Drug Design, Development and Therapy* 8 (octobre): 2075-88.
- « WHO | Guidelines for the treatment of malaria. Second edition ». *World Health Organization*. Consulté le 16 mars **2015**.  
<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241547925/en/>.
- « WHO | Leishmaniasis Fact sheet N°375 ». *World Health Organization*. Consulté le 16 décembre **2014**.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.
- « WHO | Malaria Fact sheet N°94 ». *World Health Organization*. Consulté le 16 décembre **2014**.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>.
- « WHO | Neglected tropical diseases ». *World Health Organization*. Consulté le 16 mars **2015**.  
[http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/).
- Willcox, M., F. Benoit-Vical, D. Fowler, G. Bourdy, G. Burford, S. Giani, R. Graziose, P. Houghton, M. Randrianarivelosoa, et P. Rasoanaivo. **2011**. « Do ethnobotanical and laboratory data predict clinical safety and efficacy of anti-malarial plants? ». *Malaria Journal* 10 (Suppl 1): S7.
- Woods, J.R., H. Mo, A.A. Bieberich, T. Alavanja, et D.A. Colby. **2013**. « Amino-derivatives of the sesquiterpene lactone class of natural products as prodrugs ». *MedChemComm* 4 (1): 27.
- World Health Organization. **2010**. *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases*. Geneva: Department of Reproductive health and Research, World Health Organization.
- Wu M.-L., Y.-C. Ho, et S.-F. Yet. **2010**. « A central role of heme oxygenase-1 in cardiovascular protection », *Antioxidants & Redox Signaling* 15 (7): 1835- 1846.
- Wu, R.P., T. Hayashi, H.B. Cottam, G. Jin, S. Yao, C.C.N. Wu, M.D. Rosenbach, M. Corr, R. B. Schwab, et D. A. Carson. **2010**. « Nrf2 responses and the therapeutic selectivity of electrophilic compounds in chronic lymphocytic leukemia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (16): 7479-84.

- Wu, Y., Y. Zheng, X. Liu, Z. Han, Y. Ren, L. Gan, C. Zhou, et L. Luan. **2010**. « Separation and quantitative determination of sesquiterpene lactones in *Lindera Aggregata* (Wu-Yao) by ultra-performance LC-MS/MS ». *Journal of Separation Science* 33 (8): 1072-78.
- Xia, Z., W. Qu, H. Lu, J. Fu, Y. Ren, et J. Liang. **2010**. « Sesquiterpene lactones from *Sonchus arvensis* L. and their antibacterial activity against *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ». *Fitoterapia* 81 (5): 424-28.
- Xu, G., L-Y.Peng, A-J. Hou, J. Yang, Q-B. Han, H-X. Xu, et Q-S. Zhao. **2008**. « Isolation, structural elucidation, and chemical transformation of interconvertible 8,12-hemiketal germacranolide sesquiterpenoids from *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* Stib. » *Tetrahedron* 64 (40): 9490-94.
- Xu, J., A. Chen, J. Joy, V.J. Xavier, E.H. Q. Ong, J. Hill, et C.L.L. Chai. **2013**. « Rational design of resorcylic acid lactone analogues as covalent MNK1/2 kinase inhibitors by tuning the reactivity of an enamide Michael acceptor ». *ChemMedChem* 8 (9): 1483-94.
- Yang, N.Y., J.A. Duan, E.X. Shang, et L.J. Tian. **2010**. « Analysis of sesquiterpene lactones in *Eupatorium Lindleyanum* by HPLC-PDA-ESI-MS/MS ». *Phytochemical Analysis* 21 (2): 144-49.
- Yang, Y-L., S-M. Chang, C-C. Wu, P-W. Hsieh, S-L. Chen, F-R. Chang, W-C. Hung, H.H. Issa, et Y-C. Wu. **2007**. « Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Pseudoelephantopus spicatus* ». *Journal of natural products* 70 (11): 1761-65.
- Yin, X., H. Ma, Q. You, Z. Wang, et J. Chang. **2012**. « Comparison of four different enhancing methods for preparing biodiesel through transesterification of sunflower oil ». *Applied Energy* 91 (1): 320-25.
- Youn, U.J., G. Miklossy, X. Chai, S. Wongwiwatthanakut, O. Toyama, T. Songsak, J. Turkson, et L.C. Chang. **2014**. « Bioactive sesquiterpene lactones and other compounds isolated from *Vernonia cinerea* ». *Fitoterapia* 93 (mars): 194-200.
- Youn, U.J., E-J. Park, T.P. Kondratyuk, C.J. Simmons, R.P. Borris, P. Tanamatayarat, S. Wongwiwatthanakut, et al. **2012**. « Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from the flower of *Vernonia cinerea* ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 (17): 5559-62.
- Zdero, C., et F. Bohlmann. **1990**. « Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist ». *Plant Systematics and Evolution* 171 (1-4): 1-14.
- Zehra, E. **2005**. « Resurgence of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) utilization: a global view ». *Journal of Agronomy* 4 (2): 83-87.

- Zhang, S., Y-K. Won, C-N. Ong, et H-M. Shen. **2005**. « Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms ». *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* 5 (3): 239-49.
- Zheng, X., W.Wang, H. Piao, W. Xu, H. Shi, et C. Zhao. **2013**. « The genus *Gnaphalium* L. (Compositae): phytochemical and pharmacological characteristics ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 18 (7): 8298-8318.
- Zimmermann, S., M. Kaiser, R. Brun, M. Hamburger, et M. Adams. **2012**. « Cynaropicrin: the first plant natural product with *in vivo* activity against *Trypanosoma Brucei* ». *Planta Medica* 78 (06): 553-56.
- Zimmermann, S., M. Oufir, A. Leroux, R.L. Krauth-Siegel, K. Becker, M. Kaiser, R. Brun, M. Hamburger, et M. Adams. **2013**. « Cynaropicrin targets the trypanothione redox system in *Trypanosoma brucei* ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21 (22): 7202-9.
- Zou, G., Z. Gao, J. Wang, Y. Zhang, H. Ding, J. Huang, L. Chen, Y. Guo, H. Jiang, et X. Shen. **2008**. « Deoxyelephantopin inhibits cancer cell proliferation and functions as a selective partial agonist against PPAR $\gamma$  ». *Biochemical Pharmacology* 75 (6): 1381-92



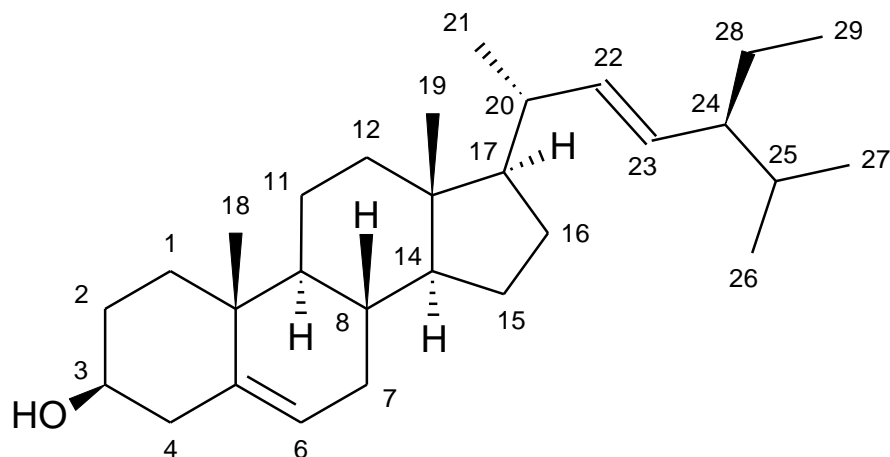


## **- ANNEXES –**



## PS1

$\beta$ -Stigmastérol, n° CAS 83-48-7



$C_{29}H_{48}O$

412 g/mole

**Aspect :** cristaux blancs (fines aiguilles)

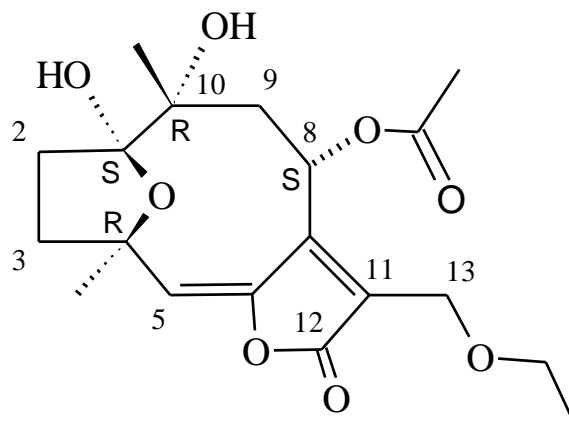
**MS :** DCI-NH<sub>3</sub>,  $m/z$  412 [M]<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H :** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  5,35 (1H, dt., H-6), 5,13 (1H, dd.,  $J$ = 15,2, 8,7 Hz, H-22), 5,03 (1H, dd.,  $J$ = 15,2, 8,7 Hz, H-23), 3,52 (1H, tt.,  $J$ = 11,1, 4,7 Hz, H-3), 2,23 et 2,28 (2H, m., H-4), 2,03 (1H, m., H-20), 1,99 et 1,95 (2H, m., H-7), 1,99 et 1,18 (2H, m., H-12), 1,84 et 1,50 (2H, m., H-2), 1,84 et 1,08 (2H, m., H-1), 1,68 (1H, m., H-16), 1,55 et 1,02 (2H, m., H-15), 1,53 (1H, m., H-24), 1,51 et 1,48 (2H, m., H-11), 1,50 (1H, m., H-8), 1,41 et 1,16 (2H, m., H-28), 1,15 (1H, m., H-17), 1,02 (3H, d., H-21) superposé avec 1,01 (3H, s., H-18) et 1,00 (1H, m., H-14), 0,93 (1H, m., H-9), 0,84 (3H, d.,  $J$ = 6,5 Hz, H-27), 0,81 (6H, m., H-26 et H-29), 0,70 (3H, s., H-19)

**RMN <sup>13</sup>C :** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  140,8 (C, C-5), 138,5 (CH, C-22), 129,4 (CH, C-23), 121,9 (CH, C-6), 71,9 (CH, C-3), 56,2 (CH, C-14), 55,6 (CH, C-17), 51,4 (CH, C-24), 50,4 (CH, C-9), 42,6 (CH<sub>2</sub> et C superposés, C-4 et C-13), 40,7 (CH, C-20), 39,9 (CH<sub>2</sub>, C-12), 37,6 (CH<sub>2</sub>, C-1), 36,8 (C, C-10), 32,2 (2 x CH, superposés, C-8 et C-25), 31,1 (2 x CH<sub>2</sub>, C-7 et C-2), 29,2 (CH<sub>2</sub>, C-16), 25,5 (CH<sub>2</sub>, C-28), 24,4 (CH<sub>2</sub>, C-15), 21,3 (CH<sub>3</sub>, C-21), 21,2 (CH<sub>3</sub>, C-18), 21,1 (CH<sub>2</sub>, C-11), 19,7 (CH<sub>3</sub>, C-27), 19,2 (CH<sub>3</sub>, C-26), 12,5 (CH<sub>3</sub>, C-29), 12,1 (CH<sub>3</sub>, C-19)

## PS9

8-acétyl-13-éthoxyptiocarphol, n° CAS 151593-37-2



$C_{19}H_{26}O_8$

382 g/mole

**Aspect :** huile jaune claire

**UV :**  $\lambda_{\max}$  (mesurée par HPLC) 284 nm

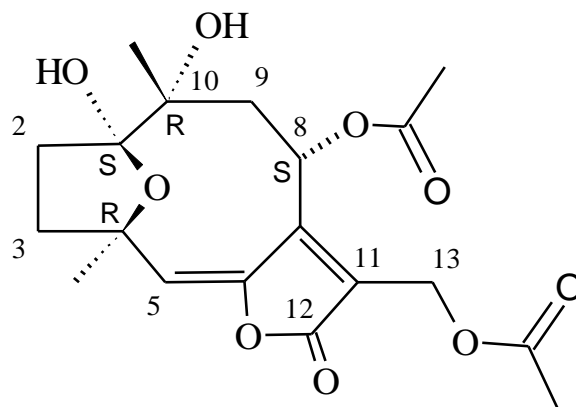
**MS :** ESI(+),  $m/z$  405 [ $C_{19}H_{26}O_8 + Na$ ]<sup>+</sup>

**RMN  $^1H$  :** ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$  6,48 (1H, sbr., H-8), 5,83 (1H, sbr., H-5), 4,52 et 4,32 (2H, deux doublets, système AB,  $J=12,3$ , H-13a,b), 4,04 (1H, br., -OH), 3,86 (1H, br., -OH), 3,55 (2H, m.,  $-OCH_2CH_3$ ), 2,53 (1H, m., H-9a), 2,42 (1H, td.,  $J=12,1$ , 7,6 Hz, H-3a), 2,11 (3H, s.,  $COCH_3$ ), 2,08 (1H, mbr., H-9b) et (1H, mbr., H-3b) superposés en un multiplet complexe, 1,77-1,95 (2H, mbr., H-2ab), 1,57 (3H, s., H-15), 1,25 (3H, sbr., H-14), 1,22 (3H, tr.,  $J=7,0$  Hz,  $-OCH_2CH_3$ )

**RMN  $^{13}C$  :** ( $CDCl_3$ , 125 MHz)  $\delta$  170,8 (C,  $COCH_3$ ), 167,6 (C, C-12), 154,3 (C, C-7), 150,5 (C, C-6), 128,7 (C, C-11), 125,7 (CH, C-5), 108,5 (C, C-1), 82,0 (C, C-4), 78,2 (C, C-10), 66,8 ( $CH_2$ ,  $-OCH_2CH_3$ ), 66,7 (CH, C-8), 61,7 ( $CH_2$ , C-13), 38,2 ( $CH_2$ , C-3) interchangeable avec 38,0 ( $CH_2$ , C-9), 31,8 ( $CH_2$ , C-2), 29,3 ( $CH_3$ , C-15), 25,4 ( $CH_3$ , C-14), 21,1 ( $CH_3$ ,  $COCH_3$ ), 15,2 ( $CH_3$ ,  $-OCH_2CH_3$ )

## PS11

Diacetylpiptocarphol, n° CAS 101628-29-9



**C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>**

396 g/mole

**Aspect :** huile incolore

**UV :**  $\lambda_{\text{max}}$  (mesurée par HPLC) 286 nm

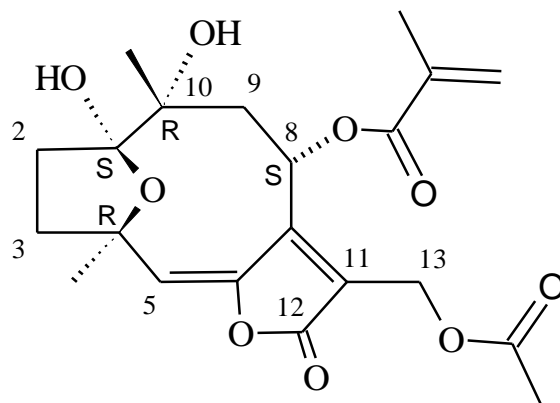
**MS :** ESI(+),  $m/z$  419 [C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>+Na]<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H :** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  6,44 (1H, sbr., H-8), 5,94 (1H, sbr., H-5), 5,20 et 4,96 (2H, deux dbr., système AB, H-13a,b), 4,09 (1H, br., -OH) et 3,84 (1H, br., -OH), 2,57 (1H, dd.,  $J=15,6, 8,5$  Hz, H-9a), 2,42 (1H, mbr., H-3a), 2,10 (1H, mbr., H-9b) et (1H, m., H-3b) superposés en un multiplet complexe, 2,11 (3H, s., COCH<sub>3</sub>) et 2,07 (3H, s., COCH<sub>3</sub>), 1,97 (1H, mbr., H-2a), 1,84 (1H, mbr., H2-b), 1,59 (3H, s., H-15), 1,26 (3H, sbr., H-14)

**RMN <sup>13</sup>C :** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  170,5 et 169,4 (C, deux COCH<sub>3</sub>), 167,5 (C, C-12), 160,8 (C, C-7), 144,2 (C, C-6), 129,3 (C, C-11), 126,9 (CH, C-5), 108,5 (C, C-1), 82,2 (C, C-4), 78,1 (C, C-10), 66,4 (CH, C-8), 55,7 (CH<sub>2</sub>, C-13), 38,1 (CH<sub>2</sub>, C-3) interchangeable avec 37,6 (CH<sub>2</sub>, C-9), 31,9 (CH<sub>2</sub>, C-2), 29,2 (CH<sub>3</sub>, C-15), 25,2 (CH<sub>3</sub>, C-14), 21,0 et 20,8 (CH<sub>3</sub>, deux COCH<sub>3</sub>)

**PS13**

piptocarphine A, n° CAS 76248-63-0

**C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>9</sub>**

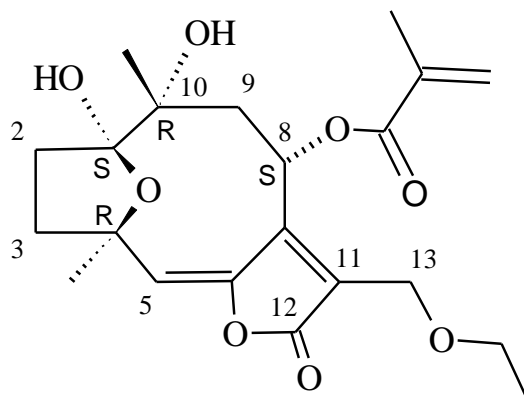
422 g/mole

**Aspect :** huile incolore**UV :**  $\lambda_{\text{max}}$  (mesurée par HPLC) 286 nm**MS :** ESI(+),  $m/z$  445 [C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>9</sub>+Na]<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H :** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  6,61 (1H, sbr, H-8), 6,28 et 5,68 (2H, deux mbr., COC(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 5,90 (1H, sbr, H-5), 5,33 et 4,90 (2H, deux d., système AB,  $J=13,0$  Hz, H-13a,b), 4,11 (1H, br., -OH) et 3,84 (1H, br., -OH), 2,61 (1H, m., H-9a), 2,40 (1H, m., H-3a), 2,10 (1H, m., H-3b) et 2,08 (1H, m., H-9b) superposés en un multiplet complexe, 2,07 (3H, s., COCH<sub>3</sub>), 1,95 (3H, m., COC(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>) et 1,94 (1H, m., H-2a) superposés en un multiplet complexe, 1,85 (1H, m., H-2b), 1,57 (3H, s., H-15), 1,25 (3H, sbr., H-14)

**RMN <sup>13</sup>C :** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  170,1 (C, COCH<sub>3</sub>), 167,3 (C, C-12), 165,3 (C, COC(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 149,9 (C, C-7), 144,1 (C, C-6), 135,7 (C, COC(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 131,2 (C, C-11), 127,4 (CH<sub>2</sub>, COC(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 126,5 (CH, C-5), 108,9 (C, C-1), 82,0 (C, C-4), 78,5 (C, C-10), 66,1 (CH, C-8), 55,8 (CH<sub>2</sub>, C-13), 38,0 (CH<sub>2</sub>, C-3) interchangeable avec 37,6 (CH<sub>2</sub>, C-9), 32,0 (CH<sub>2</sub>, C-2), 29,1 (CH<sub>3</sub>, C-15), 25,5 (CH<sub>3</sub>, C-14), 20,8 (CH<sub>3</sub>, COCH<sub>3</sub>), 18,2 (CH<sub>3</sub>, COC(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>)

## piptocarphine F



408 g/mole

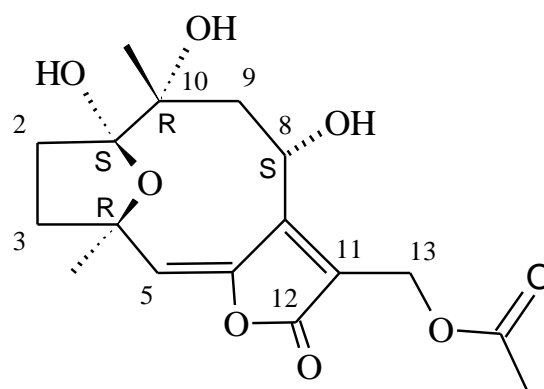
**UV :  $\lambda_{\text{max}}$  (mesurée par HPLC) 285 nm**

**RMN  $^1\text{H}$  : ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$**  6,64 (1H, dbr., H-8), 6,29 et 5,68 (2H, deux mbr.,  $\text{COC}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ ), 5,83 (1H, sbr., H-5), 4,57 et 4,35 (2H, deux d., système AB,  $J=12,2$ , H-13a,b), 3,56 (2H, m.,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 4,20 (1H, br.,  $-\text{OH}$ ), et 3,83 (1H, br.,  $-\text{OH}$ ), 2,57 (1H, dd.,  $J=16,3$  Hz, 10,8 Hz, H-9a), 2,43 (1H, m., H-3a), 2,10 (1H, m., H-9b) et 2,08 (1H, m., H-3b) superposés en un multiplet complexe, 1,95 (3H, mbr.,  $\text{COC}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ ) et 1,94 (1H, m., H-2a) superposés en un multiplet complexe, 1,85 (1H, m., H-2b), 1,57 (3H, sbr., H-15), 1,23 (3H, s., H-14), 1,23 (3H, tr.,  $J=6,3$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ )

**RMN  $^{13}\text{C}$  :** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  127,2 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{COC}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ ), 125,3 ( $\text{CH}$ , C-5), 66,9 ( $\text{CH}_2$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 66,2 ( $\text{CH}$ , C-8), 61,8 ( $\text{CH}_2$ , C-13), 38,3 ( $\text{CH}_2$ , C-3) interchangeable avec 37,7 ( $\text{CH}_2$ , C-9), 31,9 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 29,2 ( $\text{CH}_3$ , C-15), 25,7 ( $\text{CH}_3$ , C-14), 18,3 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{COC}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ ), 15,3 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{COCH}_2\text{CH}_3$ ), les déplacements chimiques des carbones quaternaires C-1, C-4, C-6, C-7, C-10, C-11, C-12 et  $\text{COC}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$  n'ont pas été assignés car l'expérience de RMN 2D HMBC n'a pas été réalisée pour le composé **PS14**.

**PS15**

piptocarphine D, n° CAS 202524-98-9

**C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>**

354 g/mole

**Aspect :** huile jaune pale**UV :**  $\lambda_{\text{max}}$  (mesurée par HPLC) 278-285 nm**MS :** ESI(+),  $m/z$  377 [C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>+Na]<sup>+</sup>,

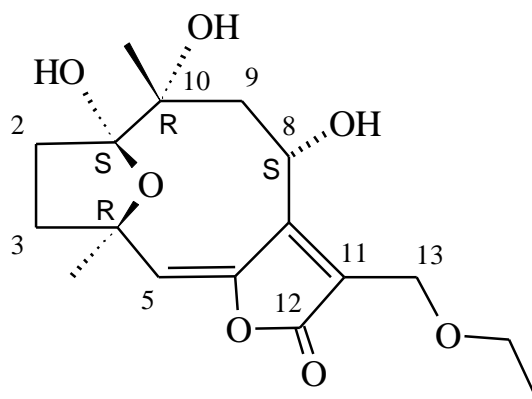
**RMN <sup>1</sup>H :** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  6,12 (1H, d.,  $J=12,0$  Hz, 8-OH), 5,88 (1H, s., H-5), 5,45 (1H, ddd.,  $J=12,0$ ,  $J=11,0$ ,  $J=2,1$ , H-8), 4,95 et 4,83 (2H, deux d., système AB,  $J=12,9$  Hz, H-13a,b), 4,80 (1H, br., -OH) et 4,50 (1H, br., -OH), 2,53 (1H, dd.,  $J=15,9$ ,  $J=11,0$  Hz, H-9a), 2,43 (1H, m., H-3a), 2,18 (1H, m., H-3b), 2,08 (3H, s., COCH<sub>3</sub>), 1,92 (1H, dd.,  $J=2,1$ ,  $J=15,9$  Hz, H-9b), 1,90-2,00 (2H, mbr., H-2ab), 1,65 (3H, s., H-15), 1,22 (3H, s., H-14) ; **(MeOD, 500 MHz)  $\delta$  forme A** 6,25 (1H, s., H-5), 5,27 (1H, dd.,  $J=8,7$ , 9,7, H-8), 4,88 et 4,81 (2H, deux d., système AB,  $J=13,0$  Hz, H-13ab), 2,79 (1H, dd.,  $J=14,0$ , 9,7, H-9a), 2,35 (1H, m., H-3a), 2,20 (1H, dd.,  $J=14,0$ , 8,7 Hz, H-9b), 2,10 (3H, s., COCH<sub>3</sub>), 1,87 et 1,78 (2H, m., H-2ab), 1,81 (1H, m., H-3b), 1,49 (3H, s., H-15), 1,26 (3H, s., H-14) ;  **$\delta$  forme B** 6,04 (1H, s., H-5), 5,44 (1H, d.,  $J=10,8$ , H-8), 4,95 et 4,88 (2H, deux d., système AB,  $J=13,0$  Hz, H-13ab), 2,51 (1H, dd.,  $J=15,9$ , 1,9, H-9a), 2,40 (1H, m., H-3a), 2,22 (1H, m., H-3b), 2,08 (3H, s., COCH<sub>3</sub>), 2,04 (1H, dd.,  $J=15,9$ , 10,8 Hz, H-9b), 2,03 et 1,92 (2H, m., H-2ab), 1,65 (3H, s., H-15), 1,22 (3H, s., H-14)

**RMN <sup>13</sup>C :** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  170,4 (C, COCH<sub>3</sub>), 166,9 (C, C-12), 154,6 (C, C-7), 144,1 (C, C-6), 127,2 (C, C-11), 124,8 (CH, C-5), 110,3 (C, C-1), 83,3 (C, C-4), 77,8 (C, C-10), 64,3 (CH, C-8), 55,0 (CH<sub>2</sub>, C-13), 38,3 (CH<sub>2</sub>, C-9), 37,7 (CH<sub>2</sub>, C-3), 32,6 (CH<sub>2</sub>, C-2), 29,2 (CH<sub>3</sub>, C-15), 26,3 (CH<sub>3</sub>, C-14), 20,9 (CH<sub>3</sub>, COCH<sub>3</sub>) ; **(MeOD, 125 MHz)  $\delta$  forme A** 170,5 (C, COCH<sub>3</sub>), 167,2 (C, C-12), 156,9 (C, C-7), 147,2 (C, C-6), 125,9 (C, C-5), 125,3 (CH, C-11), 108,6 (C, C-1), 76,1 (C, C-10), 70,3 (C, C-4), 68,0 (CH, C-8), 54,8 (CH<sub>2</sub>, C-13), 46,4 (CH<sub>2</sub>, C-9), 34,1 (CH<sub>2</sub>, C-3), 33,2 (CH<sub>3</sub>, C-15), 31,0 (CH<sub>2</sub>, C-2), 19,5 (CH<sub>3</sub>, C-14), 19,2 (CH<sub>3</sub>, COCH<sub>3</sub>) ;  **$\delta$  forme B** 170,5 (C, COCH<sub>3</sub>), 167,6 (C, C-12), 155,7 (C, C-7), 144,2 (C, C-6), 126,6 (C, C-11), 124,4 (CH, C-5), 109,9 (C, C-1), 83,1 (C, C-4), 77,3 (C, C-10), 64,1 (CH, C-8), 54,3 (CH<sub>2</sub>, C-13), 38,2 (CH<sub>2</sub>, C-9), 37,3 (CH<sub>2</sub>, C-3), 34,5 (CH<sub>2</sub>, C-2), 28,2 (CH<sub>3</sub>, C-15), 25,0 (CH<sub>3</sub>, C-14), 19,2 (CH<sub>3</sub>, COCH<sub>3</sub>)



**PS16**

(1S\*,4R\*,8S\*,10R\*)-1,4-epoxy-13-ethoxy-1,8,10-trihydroxygermacra-5*E*,7(11)-dien-6, 12-olide, n° CAS 202522-40-5



**C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub>**

340 g/mole

**Aspect :** huile jaune pale

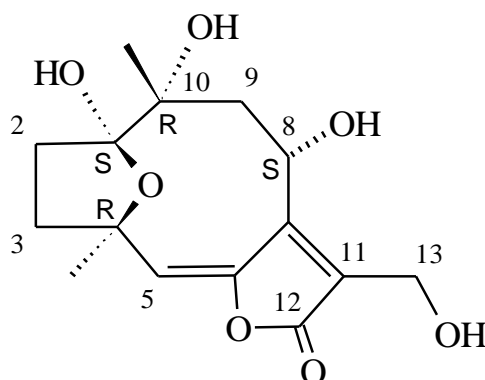
**UV :**  $\lambda_{\text{max}}$  (mesurée par HPLC) 277-281 nm

**MS :** ESI(+),  $m/z$  363 [C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub>+Na]<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H :** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  6,12 (1H, d.,  $J=12$  Hz, 8-OH), 5,84 (1H, s., H-5), 5,55 (1H, dd.,  $J=12,0$ ,  $J=11,0$ , H-8), 4,31 (2H, sbr., H-13a,b), 4,82 (1H, br., -OH) et 4,49 (1H, br., -OH), 3,56 (2H, m., -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,50 (1H, dd.,  $J=16,0$ ,  $J=11,0$ , H-9a), 2,40 (1H, m., H-3a), 2,17 (1H, m., H-3b), 1,99 (1H, m., H-9b) et 1,90-1,97 (2H, mbr., H-2ab) superposés en un multiplet complexe, 1,67 (3H, s., H-15), 1,24 (3H, s., H-14) et 1,24 (3H, ov. tr., -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) superposés en un multiplet complexe ; **(MeOD, 500 MHz)  $\delta$  forme A** 6,24 (1H, s., H-5), 5,72 (1H, dd.,  $J=8,3$ , 9,1, H-8), 4,28 (2H, sbr., H-13ab), 3,57 (2H, m., -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,85 (1H, dd.,  $J=14,0$ , 9,1, H-9a), 2,39 (1H, m., H-3a), 2,19 (1H, m., H-9b), 1,83 et 1,79 (2H, m., H-2ab), 1,82 (1H, mbr., H-3b), 1,50 (3H, s., H-15), 1,27 (3H, sbr., H-14), 1,23 (3H, ov. tr., -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ;  **$\delta$  forme B** 6,01 (1H, s., H-5), 5,44 (1H, d.,  $J=10,7$ , H-8), 4,32 (2H, dbr., H-13ab), 3,57 (2H, m., -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,50 (1H, dd.,  $J=15,9$ , 10,7, H-9a), 2,40 (1H, m., H-3a), 2,22 (1H, mbr., H-3b), 2,04 (1H, m., H-9b), 2,04 et 1,92 (2H, mbr., H-2ab), 1,66 (3H, s., H-15), 1,25 (3H, s., H-14), 1,23 (3H, ov. tr., -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C :** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  167,9 (C, C-12), 154,7 (C, C-7), 144,0 (C, C-6), 129,3 (C, C-11), 123,4 (CH, C-5), 110,3 (C, C-1), 83,9 (C, C-4), 77,5 (C, C-10), 66,8 (CH<sub>2</sub>, -OCH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 64,2 (CH, C-8), 62,0 (CH<sub>2</sub>, C-13), 38,3 (CH<sub>2</sub>, C-9), 37,6 (CH<sub>2</sub>, C-3), 32,3 (CH<sub>2</sub>, C-2), 29,4 (CH<sub>3</sub>, C-15), 26,5 (CH<sub>3</sub>, C-14), 15,0 (CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; **(MeOD, 125 MHz)  $\delta$  forme A** 169,5 (C, C-12), 157,9 (C, C-7), 149,4 (C, C-6), 129,3 (C, C-11), 126,3 (CH, C-5), 110,3 (C, C-1), 72,1 (C, C-4), 70,2 (C, C-10), 70,2 (CH, C-8), 68,3 (CH<sub>2</sub>, -OCH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 63,4 (CH<sub>2</sub>, C-13), 48,5 (CH<sub>2</sub>, C-9), 36,5 (CH<sub>2</sub>, C-3), 33,0 (CH<sub>2</sub>, C-2), 35,2 (CH<sub>3</sub>, C-15), 21,5 (CH<sub>3</sub>, C-14), 15,7 (CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ;  **$\delta$  forme B** 170,3 (C, C-12), 157,4 (C, C-7), 146,1 (C, C-6), 130,1 (C, C-11), 126,0 (CH, C-5), 111,8 (C, C-1), 84,9 (C, C-4), 79,1 (C, C-10), 66,4 (CH, C-8), 68,6 (CH<sub>2</sub>, -OCH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 62,7 (CH<sub>2</sub>, C-13), 40,5 (CH<sub>2</sub>, C-9), 38,9 (CH<sub>2</sub>, C-3), 34,1 (CH<sub>2</sub>, C-2), 29,8 (CH<sub>3</sub>, C-15), 27,8 (CH<sub>3</sub>, C-14), 15,7 (CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

**PS17**  
piptocarphol



**C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>**  
312 g/mole

**Aspect :** huile jaune pale

**UV :**  $\lambda_{\text{max}}$  (mesurée par HPLC) 279 nm

**MS :** ESI(+),  $m/z$  335 [C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>+Na]<sup>+</sup>,

**RMN <sup>1</sup>H :** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  6,10 (1H, dbr., 8-OH), 5,85 (1H, s., H-5), 5,42 (1H, dd. br., H-8), 4,55 et 4,47 (2H, deux d., système AB,  $J=13,6$  Hz, H-13a,b), 4,82 (1H, br., -OH) et 4,50 (1H, br., -OH), 2,54 (1H, dd.,  $J=15,9,11,0$  Hz, H-9a), 2,43 (1H, td.,  $J=13,0, 6,7$  Hz, H-3a), 2,15 (1H, m., H-3b), 1,95 (1H, m., H-9b) et 1,90-2,00 (2H, mbr, H-2a,b) superposés en un multiplet complexe, 1,65 (3H, s., H-15), 1,21 (3H, s., H-14) ; **(MeOD, 500 MHz)  $\delta$  forme A** 6,19 (1H, s., H-5), 5,79 (1H, dd.,  $J=9,2, 8,3$  Hz, H-8), 4,37 (2H, s., H-13a,b), 2,88 (1H, dd.,  $J=14,1, 9,2$  Hz, H-9a), 2,37 (1H, m., H-3a), 2,19 (1H, m., H-9b), 1,84 et 1,79 (2H, m., H-2a,b) et 1,83 (1H, m., H-3b) superposés en un multiplet complexe, 1,50 (3H, s., H-15), 1,26 (3H, s., H-14) ;  **$\delta$  forme B** 5,98 (1H, s., H-5), 5,54 (1H, dbr.,  $J=10,8$  Hz, H-8), 4,42 et 4,36 (2H, deux d., système AB,  $J=13,2$  Hz, H-13a,b), 2,53 (1H, dd.,  $J=15,9, 10,8$  Hz, H-9a), 2,41 (1H, m., H-3a), 2,22 (1H, m., H-3b), 2,06 (1H, m., H-9b) et 2,03 et 1,92 (2H, mbr., H-2a,b) superposés en un multiplet complexe, 1,66 (3H, s., H-15), 1,23 (3H, s., H-14)

**RMN <sup>13</sup>C :** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  168,1 (C, C-12), 152,3 (C, C-7), 144,9 (C, C-6), 130,8 (C, C-11), 124,0 (CH, C-5), 110,2 (C, C-1), 83,1 (C, C-4), 77,7 (C, C-10), 63,9 (CH, C-8), 54,6 (CH<sub>2</sub>, C-13), 38,3 (CH<sub>2</sub>, C-9), 37,7 (CH<sub>2</sub>, C-3), 32,3 (CH<sub>2</sub>, C-2), 29,4 (CH<sub>3</sub>, C-15), 26,1 (CH<sub>3</sub>, C-14) ; **(MeOD, 125 MHz)  $\delta$  forme A** 170,4 (C, C-12), 156,6 (C, C-7), 149,2 (C, C-6), 131,1 (C, C-11), 126,4 (CH, C-5), 110,0 (C, C-1), 78,0 (C, C-10), 72,2 (C, C-4), 70,2 (CH, C-8), 55,4 (CH<sub>2</sub>, C-13), 48,5 (CH<sub>2</sub>, C-9), 36,5 (CH<sub>2</sub>, C-3), 32,9 (CH<sub>2</sub>, C-2), 35,1 (CH<sub>3</sub>, C-15), 21,5 (CH<sub>3</sub>, C-14) ; **forme B** 169,7 (C, C-12), 156,1 (C, C-7), 146,1 (C, C-6), 133,1 (C, C-11), 125,8 (CH, C-5), 112,3 (C, C-1), 85,4 (C, C-4), 79,2 (C, C-10), 65,9 (CH, C-8), 54,3 (CH<sub>2</sub>, C-13), 40,6 (CH<sub>2</sub>, C-9), 39,3 (CH<sub>2</sub>, C-3), 34,1 (CH<sub>2</sub>, C-2), 30,1 (CH<sub>3</sub>, C-15), 27,5 (CH<sub>3</sub>, C-14)

## TITLE AND ABSTRACT

### Search for Michael acceptors with antiparasitic potential from an Asteraceae : *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist

Tropical diseases, including parasitosis, are major public health problems in developing countries. The few existing treatments are becoming less effective due to the emergence of pharmacoresistances, justifying the search for new therapeutic agents with innovative mechanisms. Electrophilic compounds displaying in their structure a Michael acceptor moiety (MA) are able to inhibit some of the parasites enzymatic systems, essential for their survival, and are potent modulators of the parasited host immune response. This confers them antiparasitic properties. In this context, this work presents the isolation of sesquiterpene lactones from the species *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist. These secondary metabolites display MA moieties in their structure and are potent biological active compounds. The species *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist was chosen on the basis of chimiotaxonomical and ethnopharmacological criteria and due to the very good antileishmanial activity of the ethanolic extract of the aerial parts on *Leishmania amazonensis* ( $IC_{50}=0.9 \mu\text{g/mL}$ ). The phytochemical study of *P. spiralis* led to the isolation of 7 sesquiterpene lactones exhibiting a hirsutinolide-type core in their structure, isolated from petroleum ether, ethanolic and aqueous extracts of plant's aerial parts. The isolated compounds were identified by spectroscopic techniques (NMR, MS) and tested *in vitro* for their anti-parasitic potential against two models: *L. infantum* and *Plasmodium falciparum*. In parallel their cytotoxicity on two healthy cell lines were evaluated in order to determine their selectivity indexes. Two of the isolated compounds, diacetylpiptocarphol and piptocarphin A, displayed a good activity on both parasite models but lacked of selectivity ( $SI<1$ ). These two compounds were also tested for their effects on the macrophages/monocytes stimulation. Especially the promotion of the expression of the scavenger receptor CD36 on macrophages surface and the cytoprotective Heme Oxygenase enzyme HO-1 was evaluated. CD36 receptor is involved in the recognition and the nonopsonic phagocytosis of *Plasmodia*-parasitized erythrocytes and HO-1 induction reduces the severity of trypanosomiasis and malaria in murine models. An analytical study using high resolution mass spectrometry and sequential fragmentation was led at the Louvain Drug Research Institute (Bruxells) in order to study the fragmentation of isolated hirsutinolides and to develop a method for their detection by UHPLC-DAD-MS/MS in complex extracts. This was applied to the dereplication of *P. spiralis* extracts.

**AUTEUR : Cynthia GIRARDI**

**TITRE : Recherche d'accepteurs de Michael à visées antiparasitaires à partir d'une Asteraceae : *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist**

**DIRECTEUR DE THÈSE : Professeur Nicolas FABRE**

**CO-DIRECTRICE DE THÈSE : Docteur Valérie JULLIAN**

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Faculté de Pharmacie de Toulouse, le mardi 30 juin 2015**

## **RÉSUMÉ**

Les maladies tropicales, notamment les parasitoses, constituent un problème de santé publique majeur dans les pays les moins avancés. Les rares traitements disponibles deviennent de moins en moins efficaces du fait de phénomènes de résistances, justifiant la recherche de nouveaux agents thérapeutiques possédant des mécanismes d'actions innovants. Les molécules électrophiles ayant dans leur structure un motif accepteur de Michael (AM) sont capables d'inhiber certains systèmes enzymatiques indispensables à la survie des parasites mais aussi de moduler la réponse immunitaire de l'hôte parasité, leur conférant ainsi des propriétés antiparasitaires. Dans ce contexte, ce travail de recherche a porté sur l'isolement de lactones sesquiterpéniques à partir de l'espèce *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist. Ces métabolites secondaires comportent dans leur structure des motifs AM et sont biologiquement très actifs. L'espèce *P. spiralis* a été choisie sur la base de critères chimiotaxonomiques, ethnopharmacologiques et suite au criblage de l'extrait éthanolique de ses feuilles sur *Leishmania amazonensis* (CI<sub>50</sub>=0,9 µg/mL). L'étude phytochimique de *P. spiralis* a conduit à l'isolement de 7 lactones sesquiterpéniques de type hirsutinolides à partir des extraits éther de pétrole, éthanolique et aqueux des parties aériennes de la plante. Ces molécules ont été identifiées par des techniques de spectroscopie (RMN, MS) puis testées *in vitro* sur deux modèles parasitaires : *L. infantum* et *Plasmodium falciparum*. Parallèlement, leur cytotoxicité a été évaluée sur deux lignées cellulaires saines afin de déterminer leurs indices de sélectivité. Deux de ces molécules, le diacetylopiptocarphol et la piptocarphine A, ont présenté une bonne activité sur les deux parasites mais ont manqué de sélectivité (IS<1). Ces deux composés ont également été testés pour leur effet sur la stimulation des monocytes/macrophages. Plus particulièrement, la promotion de l'expression de récepteur scavenger CD36 à la surface des macrophages et de l'enzyme cytoprotectrice Hème Oxygénase HO-1 a été évaluée. Le récepteur CD36 est impliqué dans la reconnaissance et la phagocytose non-opsonique des érythrocytes parasités par les *Plasmodia* et l'induction de HO-1 semble réduire la sévérité de trypanosomiasés et paludismes chez modèles murins. Une étude par spectrométrie de masse haute résolution et fragmentations séquentielles réalisée au Louvain Drug Research Institute (Bruxelles) a permis d'étudier la fragmentation des hirsutinolides isolés afin de développer une méthode de détection par UHPLC-DAD-MS/MS de ces composés au sein d'un extrait. Cette méthode a été appliquée à la dérégulation d'extraits de *P. spiralis*.

**MOTS-CLÉS :** Chimie des produits naturels, accepteurs de Michael, lactones sesquiterpéniques, *Pseudelephantopus spiralis*, macrophages, parasitoses

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Chimie, Biologie, Santé**

**Laboratoire de Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement (PHARMA-DEV), UMR 152, IRD, Université Paul Sabatier, 35 chemin des Maraîchers, 31400 Toulouse**